

ANA PAULA DE OLIVEIRA RIBEIRO

Berinjela transgênica cv. Embú avaliada mediante a resistência a nematóides, a insetos e aos efeitos genotóxicos pelo teste de mutação e recombinação somáticas (SMART) em asas de *Drosophila melanogaster*

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS-BRASIL

2002

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

Ribeiro, Ana Paula de Oliveira, 1977-
R484b Berinjela transgênica cv.Embú avaliada, mediante a
2002 resistência a nematóides, a insetos e aos efeitos geno-
tóxicos pelo teste de mutação e recombinação somáticas
(SMART) em asas de *Drosophila melanogaster* / Ana Paula de
Oliveira Ribeiro. – Viçosa : UFV, 2002. 85p. : il.

Orientador: Wagner Campos Otoni
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Viçosa

1. Berinjela - Transformação genética. 2. Berinjela -
Resistência a doenças e pragas. 3. Berinjela - Mutagênese. 4.
Plantas transgênicas. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 19.ed. 635.64623

CDD 20.ed. 635.64623

ANA PAULA DE OLIVEIRA RIBEIRO

Berinjela transgênica cv. Embú avaliada mediante a resistência a nematóides, a insetos e aos efeitos genotóxicos pelo teste de mutação e recombinação somáticas (SMART) em asas de *Drosophila melanogaster*

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 25 de março de 2002

Prof. Leandro Grassi de Freitas

Prof. Carlos Roberto de Carvalho

Prof. Derly José Henriques da Silva
(Conselheiro)

Prof. Júlio César Nepomuceno
(Conselheiro)

Prof. Wagner Campos Otoni
(Orientador)

Dedico, aos meus familiares; *Theodoro*, *Eliana*, *Enilce* e *Dinair*, com muito amor, carinho e admiração. Pessoas muito especiais que me apoiam sempre, me dão forças e motivos para continuar minha jornada.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela graça de viver...

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de cursar o Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro concedido.

Ao Prof. Wagner Campos Otoni, pelo ótimo convívio durante esses dois anos, paciente orientação, indispensável amizade e confiança depositada em minha pessoa.

Aos Professores Júlio César Nepomuceno e Derly José Henrique da Silva, pelos conselhos, ensinamentos e convivência amistosa.

Ao Prof. Marcelo Coutinho Picanço, pela identificação dos espécimes de pulgão e lagartas, pelas sugestões e ensinamentos durante a condução e avaliação dos experimentos.

Ao Prof. Leandro Grassi de Freitas pela disposição e paciência em nos ensinar a metodologia para a condução do experimento no laboratório de nematologia.

Aos Professores Carlos Roberto de Carvalho, Mário Antônio Spanó, Sérgio H. Brommonschenkel e Acelino Couto Alfenas pelas sugestões e críticas e por terem cedido as instalações e materiais durante a condução dos experimentos.

À Professora Rosane Maria de Aguiar Euclides, pela elaboração das eletromicrografias.

Aos Professores Cosme Damião Cruz e Paulo Roberto Cecon, pelos valiosos ensinamentos estatísticos.

Ao amigo Edgard Augusto de Toledo Picoli, pela amizade, paciência, sugestões e infundáveis discussões.

Ao José Maria, responsável pela casa de vegetação, pelo apoio na manutenção das plantas.

Aos amigos do LCT II: Andrea, Daniela, Elisionete, Fabiana, Ivar, Leonardo, Letícia, Luciano, Márcio, Maria de Lurdes, Miranda, Rodrigo, Ronelza, Tiago e Vespasiano, pelo companheirismo, amizade, paciência e auxílio no trabalho.

Ao Brenner e aos “meninos da entomologia”, Tederson, Eliseu, André e Leandro, pelo imprescindível auxílio na condução dos experimentos, avaliação e discussão dos resultados.

Aos colegas do Laboratório de Citogenética e Mutagênese (UFU): Ângela, Aparecida, Bruno, Carlos, Leila, Luciana, Regildo, Shirleny, Silma, Wânia e Wender, e pela amizade e convivência maravilhosa.

Aos amigos dos outros laboratórios: Diogo, Danival, Douglas, Miguel, Marcelo, Márcia, Edgard, Miki (Patologia Florestal), Poliane, Raquel, Eliane, Adriana, Ana (Virologia), Maíra, Maria Rita, Marcelo, Welington (Café), João Júlio, José Renato, Olinto (Micorriza), Bruno e Tatiana (Anatomia Vegetal), Pedro (Citogenética Vegetal), pelo auxílio, solidariedade, boa vontade e atenção dispensadas.

Aos amigos de curso: Gisele, Eduardo, Samuel, Adrianinha, Virgínia, João, André, Vander e Tassiano, pelo imprescindível convívio e amizade.

Às minhas queridas amigas de república, Wanessa e Kledna, pelo carinho, amizade e paciência, essenciais para minha permanência em Viçosa.

Às amigas da “Extensão”: Selma, Samantha, Kelen, Eliana, Camila, Camilinha, Tais e ao Alexandre, pela convivência e amizade.

Às outras amigas de “farra”: Raquel, Elisângela, Marciana, Gilseanne e Stella, sem as quais seria impossível permanecer nesta cidade...

Aos amigos “distantes”, Bárbara, Francis, Kátia e Maurício, pela amizade e conselhos. Amigos que, apesar da distância, estiveram sempre presentes!

Aos meus queridos familiares, Theodoro, Eliana, Enilce e Dinair, pela compreensão, estímulo e amor, indispensáveis ao meu crescimento moral.

À todas as pessoas que, direta ou indiretamente, mencionadas ou não, contribuíram para a execução deste trabalho, o meu mais sincero agradecimento.

BIOGRAFIA

ANA PAULA DE OLIVEIRA RIBEIRO, filha de Paulo Custódio Ribeiro (*in memoriam*) e Eliana Aparecida de Oliveira Ribeiro, nasceu em Cássia, no Estado de Minas Gerais, em 18 de setembro de 1977.

Graduou-se em Licenciatura Plena no ano de 1999, e em Bacharelado no ano de 2000 pelo curso de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Uberlândia. Participou do grupo PET/BIOLOGIA-CAPES/UFU, de fevereiro de 1996 a janeiro de 2000. Foi monitora das disciplinas: Citologia e Histologia (em 1995) e Genética II (em 1998). Sob orientação do Prof. Dr. Warwick Estevam Kerr, conduziu a monografia no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais – DEGEB/UFU, apresentada em 22 de dezembro de 1999.

Em março de 2000, ingressou, no Curso de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento da Universidade Federal de Viçosa, defendendo tese em março de 2002.

CONTEÚDO

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
INTRODUÇÃO GERAL	01
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	06
CAPÍTULO I	
REAÇÃO DE BERINJELA TRANSGÊNICA CONTENDO O GENE <i>orizacistatina</i> <i>A Meloidogyne incognita, M. javanica e M. arenaria</i>	
1. INTRODUÇÃO	10
2. MATERIAL E MÉTODOS	13
2.1. Material Vegetal	13
2.2. Caracterização das plantas transgênicas	13
2.3. Metodologia de extração de ovos de nematóides, inoculação e avaliação ...	14
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
4. CONCLUSÃO	19
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20
CAPÍTULO II	
AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE BERINJELA TRANSGÊNICA CONTENDO O GENE <i>orizacistatina</i> A PULGÕES [<i>Myzus persicae</i> e <i>Macrosiphum euphorbiae</i> (Homoptera: Aphididae)] E A LAGARTAS [<i>Mechanitis polymnia</i> e <i>M. lysimnia</i> (Lepidoptera: Nymphalidae)].	
1. INTRODUÇÃO	24
2. MATERIAL E MÉTODOS	27

2.1. Material Vegetal	27
2.2. Caracterização das plantas transgênicas	27
2.3. Avaliação da resistência das plantas transgênicas contendo o gene <i>orizacistatina</i> à insetos	28
2.3.1. Pulgões (Aphididae: Homoptera)	28
2.3.2. Lagartas (Nymphalidae: Lepidoptera)	30
3. RESULTADOS	31
3.1. Pulgões (Aphididae: Homoptera)	31
3.2. Lagartas (Nymphalidae: Lepidoptera)	37
4. DISCUSSÃO	40
4.1. Pulgões (Aphididae: Homoptera)	40
4.2. Lagartas (Nymphalidae: Lepidoptera)	42
5. CONCLUSÕES	44
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

CAPÍTULO III

ANÁLISE DA ATIVIDADE GENOTÓXICA INDUZIDA POR BERINJELA TRANSGÊNICA PELO TESTE DE MUTAÇÃO E RECOMBINAÇÃO SOMÁTICAS (SMART) DE *Drosophila melanogaster*

1. INTRODUÇÃO	48
2. MATERIAL E MÉTODOS	51
2.1. Material Vegetal	51
2.2. Caracterização das plantas transgênicas	53
2.3. Teste para detecção de mutações e recombinações somáticas em células de asas de <i>Drosophila melanogaster</i> para avaliação do potencial genotóxico de plantas transgênicas	53
2.4. Microscopia eletrônica de varredura	56
2.5. Identificação das bactérias isoladas dos frutos de berinjela utilizados no SMART	56
3. RESULTADOS	57
4. DISCUSSÃO	75
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

RESUMO

RIBEIRO, Ana Paula de Oliveira, M.S., Universidade Federal de Viçosa, março de 2002. **Berinjela transgênica cv. Embú avaliada mediante a resistência a insetos, a nematóides e aos efeitos genotóxicos pelo teste de mutação e recombinação somáticas (SMART) em asas de *Drosophila melanogaster*.** Orientador: Wagner Campos Otoni. Conselheiros: Derly José Henriques da Silva e Júlio César Nepomuceno.

Avaliaram-se a resistência de berinjela ‘Embú’ controle e transgênica, contendo a região codante do gene *orizacistatina*, às espécies *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria*. Foi verificado que a berinjela transgênica foi altamente suscetível a *M. incognita*, *M. arenaria* e *M. javanica*, assim como a berinjela controle as espécies *M. incognita* e *M. javanica* com grande número de galhas e número de ovos. Portanto, a transgênese não afetou a resposta de berinjela ‘Embú’ aos nematóides avaliados. A resistência às espécies de pulgões (*Myzus persicae* e *Macrosiphum euphorbiae*) e lagartas (*Mechanitis polymnia* e *Mechanitis lysimnia*) também foi avaliada. Trabalhou-se com uma geração de *M. persicae* e de *M. euphorbiae* para elaboração de tabelas de vida. Foram detectados efeitos significativos das linhagens da planta quanto às características (R_0 - taxa líquida de reprodução, r_m - razão infinitesimal de aumento populacional e λ - razão finita de aumento populacional) estudadas, exceto para tempo de geração (T). O efeito da espécie de pulgão foi significativo para todas as características, enquanto que o efeito da interação entre linhagem da planta e espécie de pulgão não foi significativo para nenhuma das características. Conclui-se que o ciclo biológico de *M. persicae* e *M. euphorbiae* foi alterado, sendo que R_0 , r_m e λ foram menores nas plantas transgênicas. Para o teste de resistência à lagartas, foram avaliados a área foliar consumida, o número de indivíduos e sua mortalidade, nas fases de desenvolvimento (da lagarta até a fase adulta). Não foram observadas significâncias para as características (duração do período

pupal, e mortalidade larval e pupal) avaliadas, à exceção da duração larval. Em relação à área foliar consumida pelas lagartas, observou-se que não houve diferença entre as linhagens da planta e na interação entre linhagem e espécie da lagarta, porém houve diferença em todos os parâmetros avaliados (área foliar total e diária consumida em centímetros quadrado e em porcentagem) quando analisada as espécies de lagarta. Assim, as plantas transgênicas utilizadas não apresentam atividade sobre a mortalidade e duração das fases larval e pupal de *Mechanitis polymnia* e *M. lysimnia*. Atividade genotóxica de extratos de berinjela transgênicos utilizados como alimento na dieta de larvas de *Drosophila melanogaster*, na forma de extratos de frutos *in natura* e aquecidos em banho-maria a 45°C foi avaliada pelo SMART (*somatic mutation and recombination test*). Em berinjela 'Embú', foram incorporados os genes das construções pRGG hpt, pOZC6 e pCLDO04541, chamados de HPT-1, OZC-2 e SW5-3, respectivamente. Foram realizados dois experimentos independentes nos quais foram testados os mesmos frutos de cada linhagem *in natura*. No experimento II foram acrescentados os mesmos frutos aquecidos e mais dois frutos: OZC-4 e SW5-5. Além desses, diluiu-se o triturado do fruto OZC-2 a uma concentração de 25%. Em cada experimento também foram incluídos um controle positivo (Ciclofosfamida) e um negativo (água). Em ambos experimentos, resultados positivos foram observados para o controle positivo e em algum dos tratamentos com berinjela transgênica *in natura* e aquecidos. Por comparação das progênies obtidas no SMART, observou que ocorreu recombinação em alta frequência. Frações de todos os frutos liofilizados das plantas transgênicas e controle, utilizados no SMART, foram mantidos a -80°C e foram, posteriormente, utilizados para detecção de *Agrobacterium tumefaciens*. Após a rehidratação dos tecidos, com água destilada e estéril, esses foram plaqueados, sob condições assépticas, e avaliado o crescimento de bactérias e sua natureza pelo teste ketolactose. Dos seis frutos utilizados (Berinjela controle, HPT-1; OZC-2, SW5-3, OZC-4, SW5-5) foram isoladas 10 colônias de bactérias, apenas dos fruto SW5-3 e SW5-5. Dessas, 5 colônias foram identificadas pelo teste Ketolactose como *Agrobacterium tumefaciens*. À luz dos resultados, conclui-se que apesar das evidências de que extrato de berinjela induziu a recombinação somática em *D. melanogaster*, a ausência de dados na literatura acerca da aplicação deste teste na caracterização de efeitos genotóxicos, advindos dos produtos dos transgenes, sugere que outros estudos devem ser conduzidos, para determinar o(s) agente(s) indutor(es) de recombinação, inclusive aqueles advindos de bactérias residentes nos tecidos de frutos transformados e de possíveis situações de estresses de natureza biótica ou abiótica.

ABSTRACT

RIBEIRO, Ana Paula de Oliveira, M.S., Universidade Federal de Viçosa, March 2002.
Transgenic eggplants (*Solanum melongena* L. cv. Embú) evaluated by means of insect and nematode resistance and to genotoxic effects by somatic mutation and recombination test (SMART) in wings of *Drosophila melanogaster*. Adviser: Wagner Campos Otoni. Committee members: Derly José Henriques da Silva and Júlio César Nepomuceno.

Control and transgenic eggplants for the *orizacystatin* gene were evaluated as for resistance to nematode species *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, and *M. arenaria*. Transgenic eggplants were highly susceptible to *M. incognita*, *M. arenaria*, and *M. javanica*, as well as the control eggplants were to *M. incognita* and *M. javanica*, with high number of galls and eggs produced in the roots. Therefore, the transgenesis did not affect the response of 'Embú' eggplant to the nematodes evaluated. The resistance to species of aphids (*Myzus persicae* and *Macrosiphum euphorbiae*) and butterfly larvae (*Mechanitis polymnia* and *Mechanitis lysimnia*) was also evaluated. For elaboration of life tables, a generation of *Myzus persicae* and *Macrosiphum euphorbiae* was used. Significant effects of plant lines were detected for the parameters studied (R_0 - net reproductive rate, r_m - intrinsic rate of population increase e λ - finite rate of population increase), except for generation time (T). The effect of aphid species was significant for all parameters evaluated, whereas the effect of interaction between plant line and aphid species was not significant for the parameters analyzed. It can be concluded that the biological cycle of *M. persicae* and *M. euphorbiae* was altered, since R_0 , r_m and λ were smaller in the transgenic plants. For the resistance test to butterfly larvae, consumed leaf area, individual number and mortality were evaluated during the different stages of its development (from larval to adult stage). Significant differences for the parameters evaluated (time period of pupal stage and larval and pupal mortality) were not observed, with exception of time period of larval stage. In relation to consumed leaf

area by the larvae, it was observed no difference between the plant lines and no interaction between the plant lines and larvae species; however, differences in all parameters evaluated (total and daily leaf area consumed) were observed depending on larvae species. Thus, the transgenic plants analyzed did not have any influence on the mortality and time period of larval and pupal stages of *Mechanitis polymnia* and *M. lysimnia*. The genotoxic activity of fruit extracts (*in natura* and preheated at 45°C) from transgenic eggplants, used as food in the diet of *Drosophila melanogaster* larvae, was evaluated by the somatic mutation and recombination test (SMART). The T-DNAs from the constructs pRGG hpt [containing the genes *hygromycin phosphotransferase (hpt)* and *β-glucuronidase (uidA)*], pOZC6 [containing the genes *orizacystatin (ozc)*, *uidA*, and *neomycin phosphotransferase II (nptII)*], and pCLDO04541 [containing the genes *npt* and *Sw5*], were incorporated into eggplant cv. Embú, called of HPT-1, OZC-2 and SW5-3, respectively. Two independent experiments were performed, in which the same fruits from each line were tested *in natura*. In the experiment II, it was added the same preheated fruits and additional two fruits: OZC-4 and SW5-5. Besides, the triturated from the fruit OZC-2 was diluted to a concentration of 25%. It was also included, in each experiment, a positive (Cyclophosphamide) and a negative (water) control. In both experiments, positive results were observed for the positive control and also in some treatments with transgenic eggplant *in natura* and preheated. Comparing the progenies obtained in the SMART, it was verified the occurrence of recombination at high frequency. Fractions of all lyophilized fruits from transgenic and control plants, used in the SMART, were kept at -80°C, and then utilized for the detection of *Agrobacterium tumefaciens*. After re-hydration of the tissues, with sterile distilled water, they were plaqued, under aseptic conditions, and the bacterial growth and nature were evaluated by the ketolactose test. Among six fruits analyzed (control, HPT-1, OZC-2, SW5-3, OZC-4, and SW5-5), bacterial colonies (total of 10) were isolated only from SW5-3 and SW5-5 fruits. Five colonies were identified by the ketolactose test as *Agrobacterium tumefaciens*. Despite evidences that extracts from transgenic eggplant induced somatic recombination in *D. melanogaster*, it can be concluded that the absence of data in the literature, concerning the application of SMART in the characterization of genotoxic effects of transgenic products, suggests that other studies need to be accomplished, aiming to determine the inductive agent(s) of recombination, including those from bacteria resident in transformed fruit tissues and from possible situations of stress of biotic and abiotic nature.

INTRODUÇÃO GERAL

Há muitos anos, plantas cultivadas vêm sendo manipuladas geneticamente pelo homem, por meio do melhoramento clássico. Características de interesse foram selecionadas e/ou transferidas à progênie mediante cruzamentos. No entanto, esses métodos convencionais de melhoramento possuem como consequências negativas: a redução do conjunto gênico, a ligação gênica e a incompatibilidade sexual, além do tempo necessário para se transferirem caracteres desejáveis para cultivares de interesse (BRASILEIRO & CARNEIRO, 1998).

O melhoramento vegetal buscou, inicialmente, o aumento de produtividade, a uniformidade da planta e da produção para permitir o uso de máquinas na colheita e adaptação a novos ambientes para expansão de fronteiras agrícolas. A resistência a doenças e pragas foi e deverá permanecer como um importante e decisivo ponto a ser considerado pelos melhoristas, devido às consideráveis perdas anuais. Os consumidores, numa tendência crescente, também estão influenciando no direcionamento dos objetivos do melhoramento de plantas, seja pela busca direta de alimentos com qualidades nutricionais específicas (teores elevados de proteína, vitaminas e sais minerais, baixos teores de gordura, entre outras), sabores diferentes, aparência, frutos sem sementes e, principalmente, preços competitivos, o que novamente, tem íntimo relacionamento com os aspectos de produtividade e outros itens relevantes na redução de custos de produção (QUEIRÓZ, 2001).

O melhoramento de plantas pode recorrer, ainda, às técnicas de engenharia genética (BRASILEIRO & CARNEIRO, 1998). Características controladas por um único gene, tais como tolerância a herbicidas e resistência a insetos foram as primeiras a serem integradas, a próxima geração de produtos transgênicos enfatiza qualidade do produto e

insertos com múltiplos genes (DUNWELL, 2000).

A berinjela (*Solanum melongena* L.) pertence à família Solanaceae, sendo os frutos desta família usados como alimentos, plantas medicinais, condimentos e algumas espécies como ornamentais. É uma planta diplóide ($2n = 24$), autógama e com taxa de fecundação cruzada que varia de 5 a 6,75% (SAMBANDAM, 1964; SANGOWAWA, 1988; BADR et al., 1997; FILGUEIRA, 2000). A domesticação da berinjela, provavelmente, ocorreu na Índia tropical e secundariamente na China. É um vegetal de grande importância em muitos países asiáticos onde frutos imaturos são servidos assados, fritos, recheados, em conservas ou cozidos (HINATA, 1986), além de seu uso medicinal (CRUZ, 1965) e ornamental (HEDRICK, 1972). Doenças fúngicas causadas por espécies de *Fusarium*, *Verticillium*, *Phythium*, *Ascochyta* e *Colletotrichum* e, bacterianas como a causada por espécies de *Pseudomonas* são prejudiciais para esta cultura. Outros patógenos, como nematóides (*Meloidogyne*) podem provocar perdas significativas na produção de berinjela (NODA, 1979; HINATA, 1986). Em algumas partes do mundo, pragas como *Leptinotarsa decemlineata* causam muitos danos, podendo levar à destruição total dos plantios (JELENKOVIC et al., 1998). Víruses que infectam a berinjela têm recebido menor atenção, apesar de ROSELLÓ et al. (1996) terem relatado a incidência de TSWV provocando perdas significativas nesta cultura.

Em função de sua relativa facilidade de manipulação *in vitro* (COLLONNIER et al., 2001), berinjela é uma espécie cuja transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* foi relatada por vários autores (FÁRI et al., 1995; ARPAIA et al., 1997; BILLINGS et al. 1997; JELENKOVIC et al., 1998; SZÁSZ et al., 1998; PICOLI, 2000).

Vários genes são conhecidos e utilizados nos processos de transformação, em programas de melhoramento ou em estudos de regulação da expressão gênica. Entre esses, podemos citar o gene *orizacistatina* (*ozc*), que codifica um inibidor de proteinase. Cistatinas (proteínas inibidoras de cisteína-proteinases) têm sido identificadas em uma variedade de espécies de animais e de plantas. O membro melhor caracterizado é a proteína *Orizacistatina* I (*Oc-I*) de arroz (ATKINSON et al., 1995). Segundo ABE et al. (1987), o mRNA de *orizacistatina* em sementes de arroz apresenta expressão máxima 2 semanas após o florescimento e diminui gradualmente até um nível não detectável a 10 semanas do amadurecimento completo. Por outro lado, a quantidade de mRNA codificando glutelina, uma proteína estocada em sementes, atinge o máximo com 3

semanas após o florescimento e também decresce gradualmente. Assim, os dois mRNAs parecem ter expressão coordenada, embora o mRNA de *orizacistatina* seja sintetizado e degradado mais drasticamente, quase que uma semana antes que o mRNA de glutelina. Este fenômeno pode refletir a existência de um sistema de regulação gênica, envolvido no controle da proteólise enzimática de glutelina durante o florescimento até o amadurecimento. Estes autores encontraram em sementes uma cisteína-proteinase que hidroliza eficientemente glutelina e é completamente inibida por uma concentração equimolar de Orizacistatina *in vitro*.

Apesar de cistatinas vegetais serem expressas em sementes e não terem função natural de defesa das plantas (ATKINSON et al., 1995), essas são utilizadas como mecanismos de defesa, pois também agem contra proteinases de insetos e patógenos (fungos, bactérias e nematóides) (RICHARDSON, 1991). O mecanismo de ação baseia-se na inibição competitiva da proteinase, via bloqueio de sua atividade proteolítica. Além das cisteína-proteinases, esses peptídeos podem ser divididos em outras três classes: serino-, metalo- e aspartil-proteinases de acordo com sua especificidade. Inibidores de cisteína-proteinases representam uma opção atrativa como estratégia de defesa, pois fazem parte de uma classe que não é expressa no sistema digestivo de mamíferos. Plantas transgênicas contendo esses inibidores de proteinases estão sendo utilizadas como estratégia de controle de nematóides (ATKINSON et al., 1995; VAIN et al., 1998) e insetos (ESTRUCH et al., 1997).

Apesar desse cenário favorável à aplicação de técnicas de cultura de tecidos e de transformação genética, com conseqüente desenvolvimento de plantas transgênicas, sabe-se, porém, que a aceitação de produtos transgênicos varia amplamente entre os diversos países. Na América do Norte há grandes áreas cultivadas com plantas transgênicas tolerantes à herbicidas e resistentes à insetos. Contudo, na Europa, os consumidores têm considerável resistência à produção e consumo de transgênicos (DUNWELL, 2000). Essa tecnologia oferece várias possibilidades para aumento da produtividade, diversificação e produção, com o desenvolvimento de uma agricultura mais sustentável, mas possui riscos potenciais ao ambiente e à saúde humana (IZQUIERDO & RIVA, 2000; CLARK & LEHMAN, 2001). Segundo CLARK & LEHMAN (2001), essa é uma técnica nova, muitos estudos foram e estão sendo conduzidos, porém muitas perguntas relativas principalmente a questões de segurança ainda não foram respondidas.

É cada vez mais crescente a busca e a necessidade de testes para verificar os

efeitos das plantas transgênicas sobre diversas pragas, fungos, nematóides, bactérias e à saúde humana. Vários testes podem ser aplicados e dentre estes, o teste de mutação e recombinação somáticas (SMART) que verificam a atividade genotóxica dos compostos testados (GUZMÁN-RINCÓN & GRAF 1995).

A *Drosophila melanogaster* é um organismo ideal para a detecção de agentes químicos e físicos com atividade genotóxica, pois este é um eucarioto com um curto tempo de geração (aproximadamente 10 dias a 25°C). Apresenta características morfológicas geneticamente determinadas, bem caracterizadas e facilmente detectáveis, permitindo que grande número de indivíduos sejam mantidos em frascos pequenos, contendo meio de cultura de fácil preparo e de baixo custo; além de possuir sistema enzimático capaz de ativar promutágenos e procarcinógenos *in vivo* (GUZMÁN-RINCÓN & GRAF, 1995).

Dois diferentes sistemas têm sido amplamente explorados, o teste de mancha na asa e no olho. Ambos são baseados no fato que durante o desenvolvimento embriogênico inicial, grupos de células (discos imaginais), originam separadamente uma região do corpo da mosca adulta, tais como: olho e asa. Eles proliferam mitoticamente durante o desenvolvimento larval até o corpo da mosca adulta (GUZMÁN-RINCÓN & GRAF, 1995). Os discos imaginais de insetos representam sistemas simples e isolados em que tais análises têm sido feitas com sucesso (GARCIA-BELLIDO & MERRIAM, 1971). Os métodos somáticos têm a vantagem de possibilitar a exposição de grandes populações de células que se encontram dividindo mitoticamente nos discos imaginais das larvas. Além disso, este pode ser realizado em apenas uma geração de mosca (GUZMÁN-RINCÓN & GRAF, 1995).

Mutações tais como as utilizadas pelo SMART, são facilmente detectadas nas asas de *D. melanogaster*. Em células normais, os pêlos são longos, finos e únicos, já em células com o fenótipo mutante pode-se observar vários pêlos em uma única célula (*multiple wing hairs - mwh*), ou ainda, um pêlo curto e grosso (*flare - flr*). Dessa maneira, o teste pode detectar a perda de heterozigosidade devido a um amplo espectro de mecanismos genéticos, tais como mutações de ponto, deleções, aberrações cromossômicas, recombinações mitóticas e conversões gênicas. Caso ocorra alguma alteração genética nas células somáticas, esta estará presente em todas as células descendentes e, quando a alteração for nos genes avaliados, causará uma mudança visível no fenótipo, o clone mutante será visualizado como uma mancha na superfície da asa da

mosca adulta (SPANÓ, 1998).

A análise dos diferentes genótipos ($mwh + / + flr^3$ e $mwh + / + TM3$) permite uma determinação quantitativa da atividade recombinogênica das genotoxinas. Em indivíduos com cromossomos estruturalmente normais, ambos eventos mutacionais e recombinacionais levam à formação de manchas simples e/ou gêmeas. Ao contrário, em indivíduos balanceadores heterozigotos, todos os eventos recombinacionais são eliminados devido a inversões múltiplas, e apenas eventos mutacionais podem dar manchas simples (mwh) (GUZMÁN-RINCÓN & GRAF, 1995).

O SMART tem a vantagem de ser um teste feito *in vivo* com um organismo eucarioto (GRAF et al., 1984). Este teste é importante, pois, fatores potencialmente mutagênicos para microrganismos ou células humanas cultivadas *in vitro* não significam necessariamente que sejam *in vivo*, visto que esses compostos podem ser excretados ou metabolizados em compostos não mutagênicos, quando introduzidos no organismo (CARVALHO, 1987). Além disso, é um teste sensível e detecta promutágenos ativados via Citocromo P-450. O SMART tem sido aplicado a várias substâncias, potencialmente genotóxicas ou antígenotóxicas, porém esse teste não foi utilizado para determinar o potencial genotóxico de plantas transgênicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, K.; EMORI, Y.; KONDO, H.; SUZUKI, K. & ARAI, S. 1987. Molecular cloning of a cysteine proteinase inhibitor of rice (Oryzacystatin). Homology with animal cystatins and transient expression in the ripening process of rice seeds. **The Journal of Biological Chemistry**, **262** (35): 16793-16797.

ARPAIA, S.; MENNELLA, G.; ONOFARO, V.; PERRI, E.; SUNSERI, F. & ROTINO, G. L. 1997. Production of transgenic eggplants (*Solanum melongena* L.) resistant to Colorado Potato Beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say). **Theoretical and Applied Genetics**, **95** (3): 329-334.

ATKINSON, H. J.; URWIN, P. E.; HANSEN, E. & McPHERSON, M. J. 1995. Designs for engineered resistance to root-parasitic nematodes. **Disease and Pest Resistance**, **13**: 369-374.

BADR, A.; KHALIFA, S. F.; ABOEL-ATTA, A. I. & ABOEL-EL-ENAIN, M. M. 1997. Chromosomal criteria and taxonomic relationships in the solanaceae. **Cytologia**, **62**: 103-113.

BILLINGS, S.; JELENKOVIC, G.; CHIN, C. K. & EBERHARDT, J. 1997. The effect of growth regulators and antibiotics on eggplant transformation. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, **122** (2): 158-162.

BRASILEIRO, A. C. M. & CARNEIRO, V. T. C. 1998. **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: CENARGEM – SPI, 309p.

CARVALHO, H. C. 1987. **Fundamentos de Genética e Evolução**. Livraria Atheneu. Rio de Janeiro. 556p.

CLARK, E. A. & LEHMAN, H. 2001. Assessment of GM crops in commercial agriculture. **Journal of Agricultural and Environmental Ethics**, **14** (2): 3-28.

COLLONNIER, C.; FOCK, I.; KASYAP, V.; ROTINO, G. L.; DAUNAY, M. C.; LIAN, Y.; MARISKA, I. K.; RAJAM, M. V.; SERVAES, A.; DUCREUX, G. & SIHACHAKR, D. 2001. Applications of biotechnology in eggplant. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, **65**: 91-107.

CRUZ, G. L. 1965. Livro verde das plantas medicinais e industriais do Brasil. **1 ed., Belo Horizonte, v. 1. p. 426.**

DUNWELL, J. M. 2000. Transgenic approaches to crop improvement. **Journal of Experimental Botany**, **51**: 487-496.

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.

FÁRI, M.; NAGY, I.; CSÁNYI, M.; MITYKÓ, J. & ANDRÁSFALVY, A. 1995. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation and plant regeneration via organogenesis and somatic embryogenesis from cotyledon leaves in eggplant (*Solanum melongena* L. cv. 'Kecskeméti'). **Plant Cell Reports**, **15**: 82-86.

FILGUEIRA, F. A. R. 2000. **Novo manual de Olericultura. Agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. Viçosa, MG. Ed. Universidade Federal de Viçosa: p. 242-245.

GARCIA-BELLIDO, A. & MERRIAM, J. R. 1971. Parameters of the wing imaginal disc development of *Drosophila melanogaster*. **Developmental Biology**, **24**: 61-87.

GRAF, U.; WÜRGLER, F. E.; KATZ, A. J.; FREI, H.; JUON, H.; HALL, C. B. & KALE, P. G. (1984). Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Environmental Mutagenesis**, **6**: 153-188.

GUZMÁN-RINCÓN, J. & GRAF, U. 1995. *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor. *In: BUTTERWORTH, A. L. (ed.). **Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change***. Plenum Press: New York. p. 169-181.

HEDRICK, U. P. H. 1972. **Stutervant's edible plants of the world**. New York: Dover Publications, Inc. 686p.

HINATA, K. 1986. Eggplant (*Solanum melongena* L.). *In: BAJAJ, Y. P. S. (ed.) **Biotechnology in agriculture and forestry***. Vol 2. New York: Springer – Verlag. p. 363-370.

IZQUIERDO, J. & RIVA, G. A. 2000. Plant biotechnology and food security in Latin America and Caribbean. **Electronic Journal of Biotechnology**, **3** (1): 1-8.

JELENKOVIK, G.; BILLINGS, S.; CHEN, Q.; LASHOMB, J.; HAMILTON, G. & GHIDIU, G. 1998. Transformation of eggplant with synthetic *cryIIIa* gene produces a high level of resistance to the colorado potato beetle. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, **123** (1): 19-25.

NODA, H. A. 1979. A cultura da berinjela (*Solanum melongena*) em Manaus. *In: von der PAHLEN, A. (ed.). **Introdução à horticultura e fruticultura no Amazonas***. CNPq – INPA, Manaus. 140p.

PICOLI, E. A. T. 2000. **Morfogênese *in vitro* e transformação genética de berinjela (*Solanum melongena* L. cv. Embú) mediada por *Agrobacterium tumefaciens***. Viçosa, MG: UFV, 2000. 141 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa.

QUEIRÓZ, M. A. 2001. Melhoramento genético no Brasil – realizações e perspectivas. *In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S. & INGLIS, M. C. V. **Recursos genéticos e Melhoramento – Plantas***. Fundação MT. Rondonópolis, MT: p. 1-29.

RICHARDSON, M. J. 1991. Seed storage protein: the enzyme inhibitors. *In: ROGER, L. J. (eds.). **Methods in Plant Biochemistry***. Academic Press: New York. p. 259-305.

ROSELLÓ, S.; DÍEZ, M. J.; NUEZ, F. 1996. Viral diseases causing the greatest economic losses to tomato crop. I. The tomato spotted wilt virus – a review. **Science Horticulturae**, **67**: 117-150.

SAMBANDAM, C. N. 1964. Natural cross pollination in eggplant (S. M.) **Economic Botany**, **18**: 128-131.

SANGOWAWA, B. G. 1988. Karyotype of west african *Solanum melongena* L. var. Gawagda. **Cytologia**, **53** (2): 241-243.

SPANÓ, M. A. 1998. Testes para detecção de mutações e recombinações somáticas em células de asas de *Drosophila melanogaster*. In: **Anais do V Encontro Mineiro de Geneticistas**, UFV: 15-16.

SZÁSZ, A.; SZILASSY, D.; SALÁNKI, K.; FÁRI, M. & BALÁZS, E. 1998. A simple and efficient method for the transformation of eggplant (*Solanum melongena* L.). **Acta Biologica Hungarica**, **46**: 201-207.

VAIN, P.; WORLAND, B.; CLARKE, M. C.; RICHARD, G.; BEAVIS, M.; LIU, H.; KOHLI, A.; LEECH, M.; SNAPE, J.; CHRISTOU, P. & ATKINSON, H. 1998. Expression of an engineered cysteine proteinase inhibitor (Oryzacystatin-IΔD86) for nematode resistance in transgenic rice plants. **Theoretical and Applied Genetics**, **96**: 266-271.

CAPÍTULO I

REAÇÃO DE BERINJELA TRANSGÊNICA CONTENDO O GENE *orizacistatina* A *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* E *M. arenaria*

1. INTRODUÇÃO

Solanum melongena L. conhecida popularmente como berinjela, pertence à família Solanaceae (FILGUEIRA, 2000), é suscetível a fungos (*Fusarium* e *Verticillium dahliae*), nematóides (*Meloidogyne*), insetos, entre outros. Assim, a inserção de genes de resistência é, juntamente com o melhoramento da qualidade do fruto e produção, um dos objetivos do melhoramento convencional e da biotecnologia (NORTHMANN & BEM-YEPHET, 1979; IBRAHIM et al., 1999; COLLONNIER et al., 2001).

A berinjela é considerada uma espécie de fácil cultivo *in vitro*, com protocolos descritos visando regeneração *in vitro* via organogênese ou embriogênese somática e transformação genética (FÁRI et al., 1995; IANNACONE et al., 1995; ARPAIA et al., 1997; JELENKOVIC et al., 1998; PICOLI et al., 2002). Uma revisão acerca das abordagens da biotecnologia à cultura de berinjela foi apresentada por COLLONNIER et al. (2001).

Dentre as metas do melhoramento de berinjela, a resistência à doenças é muito importante, contudo, a falta dessa característica de interesse no conjunto gênico, associado à incompatibilidade sexual com espécies resistentes relacionadas, são limitantes aos programas de melhoramento (ROTINO et al., 1997; COLLONNIER et al., 2001). A transgênese visando resistência a nematóides é uma opção para o melhoramento e são descritos vários genes, dentre estes os genes dominantes *Mi* (MOLINARI, 1998;

JUNG & WYSS, 1999) e *bi* (*bitter*) (HUANG, 1985).

O gene *Mi* apresenta sítio de ligação a nucleotídeos (domínio NBS) e na região C-terminal uma sequência rica em Leucina, altamente repetida (LRR). Essas regiões são encontradas em vários genes de resistência entre estes *Sw-5* e *Prf*. O *Sw-5* é um gene clonado a partir da cultivar Stevens introgridido de *Lycopersicon peruvianum* a *L. esculentum*. Esse gene confere resistência a um amplo espectro de *Tospovirus* (BROMMONSCHENKEL & TANKSLEY, 1997; BROMMONSCHENKEL et al., 2000).

Inibidores de proteinases (PIs) são outros genes que são utilizados no controle de nematóides. Inibidores de tripsina expressos em batata transgênicas reduzem a fecundidade de espécies de *Meloidogyne* e influenciam o destino sexual de *Globodera pallida*, levando a uma produção de machos menores. Outras PIs que podem ser utilizadas são as cisteína-proteinases, essas representam um alvo particularmente atrativo e são uma estratégia direta e segura de defesa, pois agem contra uma classe de proteinase que não é expressa no sistema digestivo de mamíferos (ATKINSON et al., 1995).

Nematóides são de ampla ocorrência e causam sérios danos a diversas culturas. As perdas mais evidentes devido ao ataque de nematóides ocorrem em regiões quentes (MAI, 1985). Uma infestação severa de nematóides reduz substancialmente a taxa de fotossíntese, retarda o crescimento da planta e causa substancial redução na produção em várias culturas. Muitos gêneros de nematóides têm importância econômica como parasita de plantas, mas espécies de *Meloidogyne*, também chamadas de nematóides das galhas devido aos sintomas que causam nas raízes, são responsáveis pela maioria das perdas de US\$100 bilhões anuais atribuídas aos danos causados por nematóides em todo o mundo (SASSER & FRECKMAN, 1987). Sendo assim, entre os nematóides, eles provavelmente são os causadores de danos mais importantes na agricultura, sendo encontrados em cultivares de diversas espécies. *Meloidogyne incognita* e *M. javanica* são considerados ‘parasitas universais’ das plantas (ATKINSON et al., 1995). Sua gama de hospedeiros é extensiva, parasitando mais de 2.000 espécies diferentes, monocotiledôneas e dicotiledôneas, causando a formação de galhas nas raízes das plantas hospedeiras suscetíveis (SASSER & CARTER, 1985).

Defensivos químicos, práticas culturais, controle biológico e variedades resistentes são os métodos mais utilizados para o controle de nematóides, e frequentemente utilizados de maneira integrada. O controle químico apresenta alto custo,

geralmente envolve o uso de compostos do tipo carbamatos, que são muito tóxicos e muitas vezes não são efetivos. Os problemas causados por nematicidas têm resultado em severa restrição de seu uso. Práticas culturais, tais como rotação de cultura, são amplamente usadas, mas não são adequadas individualmente. Muitos esforços na pesquisa têm sido feitos para produzir cultivares com tolerância ou resistência a nematóides e complexos de doenças, pois resistência e tolerância são métodos seguros, econômicos e fáceis de usar (MAI, 1985). Porém, cultivares resistentes têm apresentado sucesso comercial limitado, pois abrangem poucas espécies e são restritas à determinadas estações do ano (ATKINSON et al., 1995).

A berinjela é considerada altamente suscetível e boa hospedeira para nematóides de galha (IBRAHIM et al., 1999). Nesse sentido, o presente trabalho objetivou avaliar a resistência de berinjela ‘Embú’ controle e transgênica, contendo a região codante do gene *orizacistatina*, às espécies *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material Vegetal

Neste experimento foram utilizadas berinjela ‘Embú’ não transformadas (controle), adquiridas no comércio local, e plantas ‘Embú’ transformadas com o vetor pOZC6 (contendo a região codante dos genes *orizacistatina*, *β-glucuronidase* e *neomicina fosfotransferase II*).

Plantas R2, obtidas por autofecundação, foram avaliadas mediante à inoculação de nematóides. Foram utilizadas 30 plantas transgênicas e 20 controles e estas foram colocadas para germinar em substrato (Plantmax[®]) e mantidas em casa de vegetação, na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. O experimento foi conduzido de setembro a outubro de 2001.

Para a condução dos experimentos foram obedecidas as normas de biossegurança, com descarte seletivo por incineração de todo o material transgênico envolvido nos experimentos.

2.2. Caracterização das plantas transgênicas

Para identificação das plantas transgênicas foi feita a extração de DNA, utilizando folhas de plantas com aproximadamente 15 dias de idade, segundo protocolo descrito por FULTON et al. (1995). Para as reações de amplificação foram utilizados os *primers* específicos: NPT_r (GCGGTCAGCCCATTCCGCCGCC) e NPT_f (TCAGCGCAGGGGCGCCCGGTT) para o gene *npt II* (*neomicina fosfotransferase II*); e GUS_r (TTTAACTATGCCGGGATCCATCCATCGC) e GUS_f

(CCAGTCGAGCATCTCTTCAGCGTA) que identificam o gene *uidA* (β -glucuronidase). Além da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), foi realizado o ensaio histoquímico para detecção da atividade enzimática da β -glucuronidase, segundo BRASILEIRO & CARNEIRO (1998).

2.3. Metodologia de extração de ovos de nematóides, inoculação e avaliação.

Ovos de *Meloidogyne incognita*, *M. arenaria* e *M. javanica* mantidos em tomateiro, *Lycopersicon esculentum* L. var. Kada, sob condições de casa de vegetação, foram lavados das raízes com água e vertidos sobre uma peneira de 0,037mm (400 mesh) de malha. Os ovos foram recolhidos em um béquer. A concentração de ovos foi determinada utilizando-se câmara de Neubauer.

Sementes de berinjela controle e transformada foram germinadas em vasos de 5 litros contendo substrato (Plantmax[®]), mantidas por 40 dias, quando foi feita a inoculação dos nematóides. Após a confirmação das plantas transformadas por PCR e teste histoquímico β -GUS foram adicionados 5.000 ovos de cada espécie de *Meloidogyne* em cada planta, mediante a pipetagem da suspensão de ovos em orifícios próximos ao caule das plantas. O experimento foi realizado em blocos casualizados com 10 repetições.

Após 50 dias da inoculação, foram avaliados o número de galhas e de ovos das raízes de cada planta. O sistema radicular total foi separado da planta e o solo foi retirado da raiz sob água corrente. Para a extração dos ovos, as raízes foram agitadas em hipoclorito de sódio comercial em uma concentração de 20% (0,1% de NaOCl) por 3 minutos. Em seguida, a solução foi vertida sobre peneira com 25 μ m de malha (500 mesh) e lavada com água corrente. Os ovos extraídos foram transferidos para um recipiente com 100mL de água. Após, 1mL dessa solução foi retirada e os ovos contados, com o auxílio da câmara Neubauer, o número total de ovos foi estimado para cada planta. A formação de galhas foi avaliada mediante a utilização de uma escala de 0-5 que caracteriza o índice de galhas (IG). O IG foi determinado segundo metodologia de HARTMAN & SASSER (1985) e FASSULIOTIS (1985), chamados aqui de HS e FA, respectivamente.

O índice de galhas é comumente utilizado para avaliar a resposta de resistência da planta ao nematóide. O Índice de galhas de HS se baseia no número de galhas e ovos obtidos, enquanto o índice de galhas de FA se baseia na porcentagem de galhas obtidas em relação à cultivar suscetível. HS considera as seguintes categorias: (0) sem galhas –

resistente; (1) 1 a 2 galhas – resistente; (2) 3 a 10 galhas – resistente; (3) 11 a 30 galhas – suscetível; (4) 31 a 100 galhas – suscetível; e (5) mais de 100 galhas – suscetível. E FA considera: (0) sem galhas – resistente; (1) menos que 1% de galhas das plantas suscetíveis - resistentes; (2) 2 a 10% - resistente; (3) 11 a 25% - suscetível; (4) 26 a 50% - suscetível; e (5) 51 a 100% - suscetível.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Progênes R2 de berinjela transformadas foram obtidas e por meio de PCR, usando-se *primers* específicos, selecionou-se plantas contendo a inserção. Evidência adicional da natureza transgênica das plantas selecionadas foi fornecida mediante análise histoquímica da expressão do *GUS*. As plantas PCR positivas também apresentaram expressão da β -glucuronidase (dados não apresentados).

As berinjelas transgênicas foram suscetíveis a *Meloidogyne incognita*, *M. arenaria* e *M. javanica* e as controles também foram suscetíveis a *M. incognita* e *M. javanica* com grande número de galhas e número de ovos observados nas raízes (Tabela 1).

Tabela 1. Avaliação da resistência de plantas de berinjela transgênicas e controles aos nematóides das galhas *Meloidogyne javanica*, *M. arenaria* e *M. incognita*, pelo Índice de Galhas HS (HARTMAN & SASSER, 1985) e FA (FASSULIOTIS, 1985)

	Transgênica		Controle		Índice de Galhas	
	Número de ovos por planta	Número de galhas por planta	Número de ovos por planta	Número de galhas por planta	HS	FA
<i>M. javanica</i>	57.345	770	10.946	1.056	5 **	5 **
<i>M. incognita</i>	38.865	905	46.321	752	5 **	5 **
<i>M. arenaria</i>	36.493	1.140	n.a.*	n.a.*	5 **	-

n.a.* = não avaliado

5 ** = suscetível

Os índices de galhas observados foram 5 de acordo com HARTMAN & SASSER (1985) e FASSULIOTIS (1985) caracterizando elevada suscetibilidade. Poucos ovos foram obtidos de *M. arenaria*, dessa maneira não foram inoculadas as plantas controle, e

a avaliação foi feita a partir do índice de HARTMAN & SASSER (1985).

Os dados obtidos nesse trabalho são corroborados por vários outros, dessa maneira, berinjela é altamente suscetível e um bom hospedeiro para nematóides de galha (NORTHMANN & BEM-YEPHET, 1979; MAHAJAN, 1982; IBRAHIM et al., 1999). Assim como para ‘Embú’, as cultivares ‘Black Beauty’, ‘Black Long’ e ‘White Long’ foram altamente suscetíveis a *M. incognita* com grande número de galhas e massas de ovos registrados nas raízes. A infestação por nematóides não teve efeito significativo no comprimento e peso de massa seca da raiz e parte aérea das cultivares testadas, exceto para ‘White Long’, que teve uma redução significativa no peso da matéria seca das plantas (IBRAHIM et al., 1999). SONAWANE & DAREKAR (1984) testaram sessenta cultivares de berinjela e dessas apenas ‘Black Beauty’ ‘Giant de Banaras’ e espécies silvestres de *Solanum* apresentaram resistência a nematóides; o mesmo foi observado por FASSULIOTIS & DUKES (1972).

Os resultados obtidos nesse trabalho são discordantes com os encontrados por VAIN et al. (1998), possivelmente, devido à diferença no transgene utilizado no processo de transformação, pois duas proteinases podem apresentar diferentes afinidades a uma mesma proteína (ATKINSON et al., 1995). Esses autores utilizaram o OC-IAD86, um mutante no qual foi retirada o resíduo 86 de asparagina (Asp86), que otimizou a função de inibição da Orizacistatina. Segundo URWIN et al. (1995), essa região é crítica na função, pois outras modificações nessa região, inclusive a substituição desse aminoácido por outros, induz a uma redução na atividade de inibidor de proteinase em *Globodera pallida*.

A ingestão de Oc-IAD86 das plantas transgênicas foi correlacionada com a perda de atividade de cisteína-proteinase no intestino suprimindo o crescimento normal de *M. incognita*, com é requerido para defesa vegetal efetiva de vegetais. O crescimento de fêmeas de *H. schachtii* e *M. incognita* é similarmente inibido pela expressão de Oc-IAD86, essa cistatina modificada previne o desenvolvimento normal de fêmeas de ambas espécies de nematóides (URWIN et al., 1997).

Inibidores de proteinase têm pouco ou nenhum efeito nas células vegetais e para pesquisa tem-se a vantagem de que a expressão não tem que necessariamente ser específica para interferir com o desenvolvimento do nematóide, porém a regulação por promotores constitutivos possui a desvantagem desse apresentar uma expressão reduzida do transgene, necessitando de maiores estudos para determinar promotores mais efetivos

para utilizar com genes com potencial nematicida em plantas transgênicas (SIIMONS, 1993). O promotor CaMV 35S constitutivo foi utilizado nesta construção, sendo uma sugestão a utilização de promotores específicos para obtenção de respostas efetivas.

4. CONCLUSÃO

Nas condições em que os experimentos foram conduzidos e pelos resultados obtidos, conclui-se que a transgênese (a região codante do gene *orizacistatina*) não afetou a resposta de berinjela ‘Embú’ a nematóides de galhas, *M. incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARPAIA, S.; MENNELLA, G.; ONOFARO, V.; PERRI, E.; SUNSERI, F. & ROTINO, G. L. 1997. Production of transgenic eggplants (*Solanum melongena* L.) resistant to Colorado Potato Beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say). **Theoretical and Applied Genetics**, **95** (3): 329-334.

ATKINSON, H. J.; URWIN, P. E.; HANSEN, E. & McPHERSON, M. J. 1995. Designs for engineered resistance to root-parasitic nematodes. **Disease and Pest Resistance**, **13**: 369-374.

BRASILEIRO, A. C. M. & CARNEIRO, V. T. C. 1998. **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: CENARGEM – SPI, 309p.

BROMMONSCHENKEL, S. H.; FRARY, A.; FRARY, A. & TANKSLEY, S. D. 2000. The broad-spectrum *Tospovirus* resistance gene *Sw-5* of tomato is a homolog of the root-knot nematode resistance gene *Mi*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, **10**: 1130 - 1138.

BROMMONSCHENKEL, S. H. & TANKSLEY, S. D. 1997. Map-based cloning of the tomato genomic region that spans the *Sw-5* tospovirus resistance gene in tomato. **Molecular and General Genetics**, **256**: 121-126.

COLLONNIER, C.; FOCK, I.; KASYAP, V.; ROTINO, G. L.; DAUNAY, M. C.; LIAN, Y.; MARISKA, I. K.; RAJAM, M. V.; SERVAES, A.; DUCREUX, G. & SIHACHAKR, D. 2001. Applications of biotechnology in eggplant. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, **65**: 91-107.

FÁRI, M.; NAGY, I.; CSÁNYI, M.; MITYKÓ, J. & ANDRÁSFALVY, A. 1995. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation and plant regeneration via organogenesis and somatic embryogenesis from cotyledon leaves in eggplant (*Solanum melongena* L. cv. Kecskeméti). **Plant Cell Reports**, **15**: 82-86.

FASSULIOTIS, G. 1985. The role of the nematologist in the development of resistance cultivars. In: SASSER J. N. & CARTER, C. C. (ed.) **An advanced treatise on Meloidogyne** – Methodology, Vol. II, North Carolina State University Graphics. USA: p. 233-240.

FASSULIOTIS, G. & DUKES, P. D. 1972. Disease reactions of *Solanum melongena* and *S. sisymbriifolium* to *Meloidogyne incognita* and *Verticillium albo-atrum*. **Journal of Nematology**, **4** (4): 222.

FILGUEIRA, F. A. R. 2000. **Novo manual de Olericultura. Agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. Viçosa, MG. Ed. Universidade Federal de Viçosa. p. 242-245.

FULTON, T.; CHUNWONGSE, J. & TANKSLEY, S. D. (1995). Microprep protocol for extraction of DNA transfer genes. **Science**, **273**: 1107-1109.

HARTMAN, K. M. & SASSER, J. N. 1985. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal-pattern morphology. In: SASSER J. N. & CARTER, C. C. (eds.) **An advanced treatise on Meloidogyne** – Methodology, Vol. II, North Carolina State University Graphics. USA: p. 69-77.

HUANG, J. S. 1985. Mechanisms of resistance to root-knot nematodes. In: SASSER J. N. & CARTER, C. C. (eds.) **An advanced treatise on Meloidogyne** - Biology and Control, Vol. I, North Carolina State University Graphics. USA: p. 166-174.

IANNACONE, R.; FIORE, M. C.; MACCHI, A.; GRIECO, P. D.; ARPAIA, S.; PERRONE, D.; MENNELA, G.; SUNSERI, F.; CELLINI, F. & ROTINO, G. L. 1995. Genetic engineering of eggplant (*Solanum melongena* L.). **Acta Horticulturae**, **392**: 227-233.

- IBRAHIM, I. K. A.; SHAHDA, W. T. & DAWOOD, O. A. I. 1999. Pathogenicity and control of *Meloidogyne incognita* on eggplant. **Nematologia Mediterranea**, **27**: 31-33.
- JELENKOVIC, G.; BILLINGS, S.; CHEN, Q.; LASHOMB, J.; HAMILTON, G. & GHIDIU, G. 1998. Transformation of eggplant with synthetic *cryIIIa* gene produces a high level of resistance to the colorado potato beetle. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, **123** (1): 19-25.
- JUNG, C. & WYSS, U. 1999. New approaches to control plant parasitic nematodes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, **51**: 439-446.
- MAHAJAN, R. 1982. Efficacy of spot treatment with nematicides for the control of *Meloidogyne incognita* in eggplant (*Solanum melongena*). **Indian Journal of Nematology**, **12** (2): 375-419.
- MAI, W. F. 1985. Plant-parasitic nematodes: their threat to agriculture. *In*: SASSER J. N. & CARTER, C. C. (eds.) **An advanced treatise on Meloidogyne** - Biology and Control, Vol. I, North Carolina State University Graphics. USA: p. 11-17.
- MOLINARI, S. 1998. Changes of catalase and SOD activities in the early response of tomato to *Meloidogyne* attack. **Nematologia Mediterranea**, **26**: 167-172.
- NORTHMANN, J. & BEM-YEPHET, Y. 1979. Screening eggplant and other *Solanum* species for resistance to *Verticillium dahliae*. **Plant Disease Reporter**, **63** (1): 70-73.
- PICOLI, E. A. T.; LIMA, G. S. A.; LAU, D.; OLIVEIRA, J. C. F. F.; BROMMONSCHENKEL, S. H. & OTONI, W. C. 2002. *Sw-5* gene: incorporation in eggplant and *Tospovirus* resistance analysis in a heterologous system (Submetido).
- ROTINO, G. L.; PERRI, E.; ACCIARRI, N.; SUNSERI, F. & ARPAIA, S. 1997. Development of eggplant varietal resistance to insects and diseases via plant breeding. **Advanced Horticultural Science**, **11**: 193-201.

SASSER, J. N. & CARTER, C. C. 1985. Overview of the international *Meloidogyne* project 1975-1984. *In*: SASSER J. N. & CARTER, C. C. (eds.) **An advanced treatise on *Meloidogyne* - Biology and Control**, Vol. I, North Carolina State University Graphics. USA: p. 19-24.

SASSER, J. N. & FRECKMAN, D. W. 1987. A word perspective on nematology: the role of the Society. *In*: VEECH, J. A. & DICKSON, D. W. (eds.) **Vistas on Nematology: a comemoration of the twenty-fifth anniversary of the Society of Nematologists**. Hyattsville, Maryland: Society of Nematologists. p. 19-24.

SIJMONS, P. C. 1993. Plant-nematode interactions. **Plant Molecular Biology**, **23**: 917-931.

SONAWANE, M. L. & DAREKAR, K. S. 1984. Reaction of eggplant cultivars and *Solanum* species to *Meloidogyne incognita*. **Nematologia Mediterranea**, **12**: 149.

URWIN, P. E.; ATKINSON, H. J.; WALLER, D. A. & McPHERSON, M. J. 1995. Engineered oryzacystatin-I expressed in transgenic hairy roots confers resistance to *Globodera pallida*. **The Plant Journal**, **8** (1): 121-131.

URWIN, P. E.; LILLEY, C. J.; McPHERSON, M. J. & ATKINSON, H. J. 1997. Resistance to both cyst and root-knot nematodes conferred by transgenic *Arabidopsis* expressing a modified plant cystatin. **The Plant Journal**, **12** (2): 455-461.

VAIN, P.; WORLAND, B.; CLARKE, M. C.; RICHARD, G.; BEAVIS, M.; LIU, H.; KOHLI, A.; LEECH, M.; SNAPE, J.; CHRISTOU, P. & ATKINSON, H. 1998. Expression of an engineered cysteine proteinase inhibitor (Oryzacystatin-IΔD86) for nematode resistance in transgenic rice plants. **Theoretical and Applied Genetics**, **96**: 266-271.

CAPÍTULO II

AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE BERINJELA TRANSGÊNICA CONTENDO O GENE *orizacistatina* A PULGÕES [*Myzus persicae* E *Macrosiphum euphorbiae* (Homoptera: Aphididae)] E A LAGARTAS [*Mechanitis polymnia* E *M. lysimnia* (Lepidoptera: Nymphalidae)]

1. INTRODUÇÃO

Berinjela (*Solanum melongena*) tem ampla variabilidade nos caracteres morfológicos (cor, forma e tamanho), atributos fisiológicos, características químicas (FILGUEIRA, 2000) e possui suscetibilidade a muitos patógenos e pragas. A introgressão por melhoramento convencional ou pela biotecnologia, de genes de resistência a doenças em variedades de berinjela cultivadas é necessária (COLLONNIER et al., 2001).

Os problemas fitossanitários são semelhantes àqueles apresentados pelas demais Solanáceas-fruto, como: septoriose, cancro-bacteriano, tospovirose, geminivirose, ácaros fitófagos e nematóides. Entre os insetos pragas pode-se citar os afídeos, (*Myzus persicae*, *Macrosiphum euphorbiae* e *Aphis gossypii*), a mosca-branca (*Bemisia tabaci* e *B. argentifolii*), tripes e cigarrinha (FILGUEIRA, 2000).

Os pulgões, dentre eles *Myzus persicae* (Sulzer) e *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas) (Homoptera: Aphididae), estão entre as pragas secundárias da cultura de Solanáceas. Pulgões causam grandes prejuízos pela sucção contínua de seiva, o que acarreta perda de coloração, atraso no crescimento, prejudicando, assim, o desenvolvimento da planta, podendo até ocasionar sua morte (BASTOS et al., 1996).

Outras espécies que atacam Solanáceas em condições de campo são *Mechanitis polymnia* e *M. lysimnia* (Lepidoptera: Nymphalidae). PICANÇO (1986) verificou que a infestação de plantas pela praga tende a acontecer em períodos de alta temperatura e em plantas bastante desenvolvidas. Os adultos dessas espécies são borboletas de cores vivas, facilmente capturadas devido ao vôo lento e baixo. A fêmea efetua a postura na superfície adaxial da folha; os ovos são depositados em um mesmo local e as lagartas vivem em colônia na superfície adaxial das folhas das Solanáceas (GALLO et al., 1978).

O melhoramento vegetal buscando a incorporação de resistência varietal e a manutenção da mesma é necessária para diminuir as perdas de produção. Plantas resistentes a insetos reduzem os custos, tempo e esforços gastos na proteção de plantas e podem contribuir para um ambiente menos poluído (JOUANIN et al., 1998).

Genes de resistência podem ser introduzidos a plantas cultivadas, pelas técnicas de engenharia genética, auxiliando o melhoramento clássico (JOUANIN et al., 1998). A engenharia genética é uma ferramenta para os melhoristas complementarem as técnicas utilizadas no melhoramento de variedades existentes, nas quais pode-se inserir genes codificando para características agrônômicas úteis (COLLONNIER et al., 2001).

Protocolos para introduzir genes no genoma de berinjela via *Agrobacterium tumefaciens* estão disponíveis (FÁRI et al., 1995; IANNACONE et al., 1995; ROTINO et al., 1997; COLLONNIER et al., 2001). Berinjelas transgênicas resistentes ao besouro do colorado da batata (CPB) foram obtidas por genes *Bt cryIII* mutantes. Genes *Bt* anti-lepidoptera *cryI* e *cryII* podem ser utilizados para verificar a sensibilidade do besouro à toxina presente nas folhas e frutos e o possível controle dessa praga no campo (ROTINO et al., 1997). IANNACONE et al. (1995) inseriram em berinjela 'Picentia' o gene *cry3b* de *Bacillus thuringiensis* e o mesmo gene modificado por mutagênese dirigida (*cryM*). Esses autores encontraram falta de expressão do gene *cry3b* e com poucas modificações, cerca de 5%, no gene *cryM* observou um aumento significativo na resistência ao besouro. Berinjelas transgênicas contendo o gene mutante (*cryM*) produziram níveis suficientes da proteína CryIIIB e apresentaram proteção completa ao ataque de larvas do CPB (ARPAIA et al., 1997).

Outro gene oriundo de bactéria, o *ipt* (*isopentenil transferase*), está envolvido na biossíntese de citocinina. O *ipt* foi introduzido em *Nicotiana plumbaginifolia* com o controle do promotor de batata o gene inibidor de proteinase II induzido por fermentos. A expressão desse gene (ou dos genes envolvidos na produção de metabólitos

secundários induzidos pela expressão do gene *ipt*) é deletéria à *Manduca sexta* (Lepidoptera) e *Myzus persicae*. Porém, a expressão em plantas não é compatível com a obtenção de plantas transgênicas com um fenótipo selvagem. O mecanismo não está claro, mas suspeita-se do envolvimento de metabolitos secundários (JOUANIN et al., 1998).

Proteínas inseticidas que interferem com a necessidade nutricional dos insetos têm sido descritas. Pode-se citar como exemplos: Polifenol Oxidases (geram compostos tóxicos dos componentes da dieta), inibidores de proteinase e inibidores de α -amilase privam os insetos de nutrientes por interferir com as enzimas digestivas do inseto. Inibidores de proteinases têm ampla aceitação devido à sua abundância e estabilidade. Eles são usualmente muito específicos para uma classe particular de enzimas digestivas. Tem sido reportado plantas transgênicas expressando inibidores de proteinases que agem primariamente como retardantes do crescimento de insetos (ESTRUCH et al., 1997).

Os afídeos representam um grupo de praga não efetivamente controlada por plantas transgênicas e, por isso, é importante que os efeitos das plantas transgênicas sobre os insetos afídeos como antagonistas naturais seja investigado (SCHULER et al., 2001). Diante do exposto, os objetivos desse trabalho foram: avaliar o nível de expressão de resistência e/ou efetividade inseticida dos produtos do gene *orizacistatina* em linhagens transgênicas, (1) mediante a comparação das tabelas de vida de *Myzus persicae* e *Macrosiphum euphorbiae* e (2) mortalidade (larval e pupal), duração (das fases larval e pupal) e área foliar consumida por *Mechanitis polymnia* e *M. lysimnia*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal

Neste experimento foi utilizada berinjela (*Solanum melongena* L. ‘Embú’). Plantas não transformadas utilizadas como controle, foram adquiridas no comércio local. Berinjela transgênica foram obtidas a partir da germinação de sementes R1. As berinjelas transgênicas foram transformadas com o vetor pOZC6 (contendo a região codante dos genes *orizacistatina*, *β-glucuronidase* e *neomicina fosfotransferase II*).

Plantas R2, obtidas por autofecundação, foram avaliadas. Foram utilizados 16 plantas transgênicas e 16 plantas controles. Sementes dessas plantas foram germinadas em substrato (Plantmax[®]) e mantidas em casa de vegetação, na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

Para a condução dos experimentos foram obedecidas as normas de biossegurança, com descarte seletivo por incineração de todo o material transgênico envolvido nos experimentos.

2.2. Caracterização das plantas transgênicas

Os procedimentos citados na condução dos experimentos são conforme descrito no item 2.2 do Capítulo I.

2.3. Avaliação da resistência das plantas transgênicas contendo o gene *orizacistatina* a insetos

Após identificação por PCR (item 2.2), foram selecionadas plantas transformadas contendo o gene *orizacistatina*, além de plantas controle utilizadas como testemunhas. O experimento foi conduzido de setembro a outubro de 2000.

A metodologia de avaliação foi segundo procedimentos adotados pelo Laboratório de Manejo Integrado de Pragas (MIP), do Departamento de Biologia Animal, da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

Os experimentos foram montados em esquema fatorial 2x2 (duas linhagens de berinjela e duas espécies de insetos). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), com 8 repetições. Cada parcela experimental constituiu de um vaso de polietileno, com capacidade de 5 litros, contendo uma planta de berinjela. Os dados experimentais foram submetidos à análise de variância (ANOVA), a 5% de significância.

2.3.1. Pulgões (Homoptera: Aphididae)

O afídeo *M. persicae* foi obtido de plantas de berinjela infectadas em casa de vegetação. *M. euphorbiae* foi obtido de plantas de *Lycopersicon esculentum* L. 'Santa Clara' infectadas em casa de vegetação, mantidos pelo MIP/UFV.

Na instalação da pesquisa, 10 indivíduos de até um dia de idade foram colocados sobre uma folha de cada planta e a folha foi coberta com saco de organza (20 x 28cm), cada espécie foi colocada em folhas distintas. A cada três dias, foi contado o número de pulgões vivos e avaliado o seu estágio de desenvolvimento e o número de ninfas paridas, sendo as ninfas paridas e os indivíduos mortos removidos.

A elaboração das tabelas de vida foi feita segundo SILVEIRA NETO et al. (1976), utilizando-se como base 80 indivíduos. Trabalhou-se com uma geração de *M. persicae* e *M. euphorbiae*.

A tabela de vida de fertilidade foi constituída de:

x = intervalo de idade em semanas;

mx = fertilidade específica (significando número de fêmeas produzidas por fêmea sobrevivente no intervalo de idade x); e,

l_x = taxa de sobrevivência (proporção de indivíduos vivos no ponto médio do intervalo de idade x).

De posse desses dados, foram calculados os seguintes parâmetros:

T = tempo de geração em semanas (o tempo decorrido desde o nascimento dos pais até o nascimento dos seus descendentes), obtidos pela seguinte fórmula:

$$T = \frac{\sum(mx.lx.x)}{\sum(mx.lx)}$$

R_o = taxa líquida de reprodução (número de descendentes fêmeas que darão origem a fêmeas no curso de uma geração), calculada pela seguinte fórmula:

$$R_o = \sum(mx.lx)$$

rm = razão infinitesimal de aumento populacional (a capacidade de aumentar em número), calculada por meio da expressão:

$$rm = \frac{\ln .R_o}{T}$$

λ = razão finita de aumento populacional (o número de fêmeas adicionadas à população por fêmea por semana). É dada por:

$$\lambda = e^{rm}$$

Foi avaliado o efeito dos tratamentos sobre esses parâmetros reprodutivos, por meio da análise de variância (ANOVA), ao nível de significância de 5%.

A tabela de esperança de vida foi composta das seguintes colunas:

x = intervalo de idade (semanas);

L_x = número médio de sobreviventes no início da idade x ;

dx = número de indivíduos mortos no intervalo etário x ; e,

E_x = estrutura etária (o número de insetos vivos entre um intervalo de idade e outro), calculada segundo a expressão:

$$E_x = \frac{L_x + L_{x+1}}{2}$$

T_x = número de insetos de idade x , além da idade x , dado por:

$$T_x = E_x + E_{x+1} + E_{x+2} + \dots + E_w$$

em que w é o último estágio.

ex = esperança de vida para os indivíduos de idade x , dada por:

$$ex = \frac{T_x}{L_x}$$

$100q_x$ = razão de mortalidade por intervalo de idade, ou seja, é a coluna de risco. É calculada por:

$$100q_x = 100 \frac{dx}{Lx}$$

2.3.2. Lagartas (Lepidoptera: Nymphalidae)

Para o teste de resistência à lagartas, foram utilizadas as espécies *Mechanitis polymnia* e *M. lysimnia*. Massas de ovos foram coletadas no campo e mantidos até a eclosão em câmara de crescimento à 25°C e 75% UR. As lagartas de cada espécie foram depositadas sobre folhas expandidas da região mediana de plantas com aproximadamente seis meses e, em seguida, cobertas com saco de organza (20 x 28cm).

A cada dois dias foram avaliados o número de indivíduos e sua mortalidade, nas fases de desenvolvimento da lagarta até a fase adulta, durante todo o período de condução do experimento.

Para determinar a área foliar consumida pelas lagartas, mediu-se o comprimento e a largura das mesmas. Após a morte das lagartas, ou ao consumo de toda a área foliar, o restante foi retirado com as devidas anotações. Para tal, várias folhas foram selecionadas, fotocopiadas, cortadas e pesadas. Em seguida, um quadrado de papel de 16 cm², foi pesado, e, por comparação da área e peso do quadrado com a fotocópia das folhas, foi determinado um índice (1,52). As folhas consumidas pela lagarta foram impressas, cortadas e pesadas. A partir do índice foi determinada a área inicial das folhas e a área foliar restante após o consumo da lagarta.

As características mortalidade, duração da fase larval e pupal, área foliar diária e total consumidas foram submetidas à análise de variância (ANOVA), 5% de significância, para comparação do efeito dos tratamentos.

3. RESULTADOS

3.1. Pulgões (Homoptera: Aphididae)

Detectou-se efeitos significativos das linhagens da planta quanto às características estudadas, exceto para tempo de geração. O efeito de espécie de pulgão foi significativo para todas as características, enquanto que o efeito da interação entre linhagem da planta e espécie de pulgão não foi significativo para nenhuma das características (Tabela 1).

Para *Myzus persicae*, observou-se que as características T (tempo de geração), Ro (Taxa líquida de reprodução), rm (razão infinitesimal de aumento populacional) e λ (razão finita de aumento populacional) apresentaram as maiores médias nas plantas controle do que nas plantas transgênicas (Tabelas 2 e 3).

A razão finita de aumento populacional (λ) foi de 2,31 e 1,88 nas plantas controle e transgênica. Isso significa que ao fim de 31 dias, esperavam-se 16 fêmeas resultantes de cada fêmea em fase de reprodução nas plantas controle. E nas plantas transgênicas ao final de 24 dias, 8 fêmeas. Sendo estes valores diferentes estatisticamente.

A tabela de esperança de vida permite sintetizar as características de mortalidade e expectativa de vida para cada intervalo de idade. Observou-se que a longevidade de *M. persicae* foi maior nas plantas controle, chegando a 28 dias, enquanto nas plantas transgênicas foi de 24 dias. A esperança inicial também foi maior nas plantas controle 4,24, quando comparadas com 3,32 nas plantas transgênicas. Para cada valor de esperança de vida (ex), tem-se um valor correspondente da coluna de risco (100 qx), que indica a probabilidade de ocorrer a morte desses indivíduos antes do prazo estabelecido pela coluna ex. O risco observado nas fases iniciais e finais em ambas as linhagens são próximos, porém o ciclo de vida do pulgão foi mais rápido nas plantas transgênicas

(Tabela 4).

Em ambos os tratamentos houve queda relativa a partir da primeira semana, sem a estabilização da curva. Pode-se notar que a curva das larvas tratadas com plantas transgênicas foi menor que das larvas tratadas com plantas controle (Figura 1).

Tabela 1. Resumo da análise de variância das características das tabelas de vida de fertilidade para *Macrosiphum euphorbiae* e *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae) em berinjelas transgênica e controle. Viçosa, MG, 2000

Fontes de variação	QM				
	GL	T	Ro	rm	λ
Linhagens (L)	1	0,16	348,07*	1,34*	2,16*
Espécie de pulgão (E)	1	2,33*	337,42*	0,72*	2,94*
L x E	1	0,40	1,11	0,18	0,73
Resíduo	60	0,27	37,34	0,19	0,30
Coefficiente de variação (%)		16,73	69,39	86,80	11,36

* Significativo a $p < 0,05$

QM = quadrado médio; GL – graus de liberdade; T = Tempo de geração; Ro = Taxa líquida de reprodução; rm = Razão infinitesimal de aumento populacional; e, λ = Razão finita de aumento populacional

Tabela 2. Médias \pm desvios padrão das características da tabela de vida de fertilidade para *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae) em berinjelas controle e transgênica. Viçosa, MG, 2000

Características	Linhagens de berinjela	
	Controle	Transgênica
Tempo de geração (semanas) – T	3,07 \pm 0,33	2,69 \pm 0,41
Taxa líquida de reprodução – Ro	15,55 \pm 8,00	8,34 \pm 6,90
Razão infinitesimal de aumento populacional - rm	0,83 \pm 0,16	0,45 \pm 0,74
Razão finita de aumento populacional - λ	2,31 \pm 0,35	1,88 \pm 0,89

Tabela 3. Tabela de vida de fertilidade para *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae) em berinjelas controle e transgênica. Viçosa, MG, 2000

x	Controle				Transgênica				Fase
	mx	lx	Mxlx	mxlxx	mx	lx	mxlx	mxlxx	
1	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	Ninfal
1,5	0,00	0,95	0,00	0,00	0,00	0,95	0,00	0,00	
2	0,09	0,86	0,08	0,53	0,44	0,83	0,36	2,54	Adulta
2,5	6,28	0,71	4,48	46,99	9,79	0,48	4,65	48,83	
3	8,49	0,49	4,14	57,93	5,62	0,26	1,48	20,65	
3,5	10,59	0,40	4,24	74,16	7,85	0,16	1,28	22,31	
4	7,93	0,19	1,49	31,24	4,09	0,14	0,56	11,81	
4,5	10,00	0,10	1,00	24,50	1,00	0,01	0,01	0,31	
5	3,67	0,04	0,14	3,85	
5,5	0,00	0,04	0,00	0,00	
Σ	47,05	4,78	15,57	239,2	28,79	3,83	8,34	106,45	

x = intervalo de idade (semanas); mx = fertilidade específica; e lx = taxa de sobrevivência.

Tabela 4. Tabela de esperança de vida para *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae) em berinjelas controle e transgênica. Viçosa, MG, 2000

Tratamento	x	Lx	dx	Ex	Tx	ex	100 qx
Controle	1	10,00	0,50	9,75	42,37	4,24	5,00
	1,5	9,50	0,87	9,06	32,62	3,43	9,21
	2	8,62	1,50	7,87	23,56	2,73	17,39
	2,5	7,12	2,25	6,00	15,69	2,20	31,58
	3	4,87	0,87	4,44	9,69	1,99	17,95
	3,5	4,00	2,12	2,94	5,25	1,31	53,12
	4	1,87	0,87	1,44	2,31	1,23	46,67
	4,5	1,00	0,62	0,69	0,87	0,87	62,50
Transgênica	1	10,00	0,50	9,75	33,25	3,32	5,00
	1,5	9,50	1,25	8,87	23,50	2,47	13,16
	2	8,25	3,50	6,50	14,62	1,77	42,42
	2,5	4,75	2,12	3,69	8,12	1,71	44,74
	3	2,62	1,00	2,12	4,44	1,69	38,09
	3,5	1,62	0,25	1,50	2,31	1,42	15,38
	4	1,37	1,25	0,75	0,81	0,59	90,90
	4,5	0,12	0,12	0,06	0,06	0,50	100,00

x = intervalo de idade (semanas); Lx = número médio de sobreviventes no início da idade x; dx = número de indivíduos mortos durante o intervalo x; Ex = estrutura etária; Tx = número total de insetos de idade x além da idade x; ex = esperança de vida para os indivíduos de idade x; e, 100 qx = razão de mortalidade por intervalo de idade.

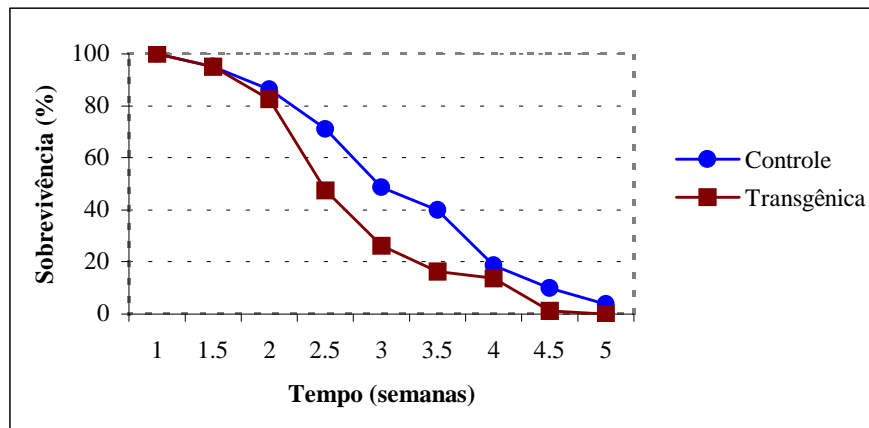


Figura 1. Sobrevivência de *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae) alimentado com berinjelas transgênica e controle. Viçosa, MG, 2000

Para *Macrosiphum euphorbiae* observou-se também que as médias das características R_0 (Taxa líquida de reprodução), r_m (razão infinitesimal de aumento populacional) e λ (razão finita de aumento populacional) das plantas controle foram maiores (Tabela 5).

A razão finita de aumento populacional (λ) foi de 1,79 e 1,15 nas plantas controle e transgênica. Isso significa que ao fim de 38 dias, esperavam-se 8 fêmeas resultantes de cada fêmea em fase de reprodução nas plantas controle. E nas plantas transgênicas ao final de 42 dias, 2 fêmeas. Sendo estes valores diferentes estatisticamente.

Na tabela de esperança de vida, ao contrário do observado para *M. persicae*, a longevidade foi maior nas plantas transgênicas, chegando a 42 dias, enquanto nas plantas controle foi de 38 dias. A esperança inicial foi maior nas plantas controle 4,30, quando comparadas com 3,65 nas plantas transgênicas. O risco observado nas plantas transgênicas foi maior que nas plantas controle para nas fases iniciais (Tabelas 6 e 7).

Em ambos os tratamentos houve queda brusca relativamente aproximadamente a 2 semanas. A partir de 4,5 semanas houve estabilização da curva. Pode-se notar que a curva das larvas tratadas com berinjelas transgênica foi menor que das larvas tratadas com berinjelas controle (Figura 2).

Tabela 5. Médias \pm desvios-padrão das características das tabelas de vida de fertilidade para *Macrosiphum euphorbiae* (Homoptera: Aphididae) em berinjelas controle e transgênica. Viçosa, MG, 2000

Características	Linhagens de berinjela	
	Controle	Transgênica
Tempo de geração (semanas) – T	3,40 \pm 0,49	3,48 \pm 1,54
Taxa líquida de reprodução – Ro	7,39 \pm 5,74	1,75 \pm 1,87
Razão infinitesimal de aumento populacional - rm	0,57 \pm 0,17	0,10 \pm 0,33
Razão finita de aumento populacional - λ	1,79 \pm 0,31	1,15 \pm 0,37

Tabela 6. Tabela de vida de fertilidade para *Macrosiphum euphorbiae* (Homoptera: Aphididae) em berinjelas controle e transgênica. Viçosa, MG, 2000

x	Controle				Transgênica				Fase
	mx	lx	mxlx	mxlxx	mx	Lx	mxlx	mxlxx	
1	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	Ninfal
1,5	0,00	0,93	0,00	0,00	0,00	0,84	0,00	0,00	
2	0,10	0,86	0,09	0,61	0,35	0,83	0,29	2,05	Adulta
2,5	1,13	0,60	0,68	7,09	0,03	0,51	0,01	0,14	
3	3,76	0,51	1,93	26,95	1,38	0,32	0,44	6,16	
3,5	6,59	0,40	2,64	46,16	1,33	0,28	0,37	6,53	
4	3,50	0,35	1,23	25,73	2,14	0,19	0,40	8,40	
4,5	9,50	0,05	0,48	11,64	1,86	0,09	0,17	4,25	
5	4,00	0,03	0,10	2,80	0,00	0,03	0,00	0,00	
5,5	7,50	0,03	0,19	5,91	1,00	0,03	0,03	0,84	
6	2,00	0,03	0,05	1,89	1,00	0,02	0,02	0,56	
6,5	1,00	0,03	0,03	1,12	0,00	0,02	0,00	0,00	
7	3,00	0,03	0,08	3,32	
Σ	39,08	4,81	7,40	129,88	12,09	4,16	1,81	32,24	

x = intervalo de idade (semanas); mx = fertilidade específica; e, lx = taxa de sobrevivência.

Tabela 7. Tabela de esperança de vida para *Macrosiphum euphorbiae* (Homoptera: Aphididae) em berinjelas controle e transgênica. Viçosa, MG, 2000

Tratamento	x	Lx	dx	Ex	Tx	ex	100 qx
Controle	1	10,00	0,75	9,63	43,00	4,30	7,50
	1,5	9,25	0,63	8,94	33,38	3,61	6,76
	2	8,63	2,63	7,31	24,44	2,83	30,43
	2,5	6,00	0,88	5,56	17,13	2,85	14,58
	3	5,13	1,13	4,56	11,56	2,26	21,95
	3,5	4,00	0,50	3,75	7,00	1,75	12,50
	4	3,50	3,00	2,00	3,25	0,93	85,71
	4,5	0,50	0,25	0,38	1,25	2,50	50,00
	5	0,25	0,00	0,25	0,88	3,50	0,00
	5,5	0,25	0,00	0,25	0,63	2,50	0,00
Transgênica	6	0,25	0,00	0,25	0,38	1,50	0,00
	6,5	0,25	0,25	0,13	0,13	0,50	100,00
	1	9,38	1,50	8,63	34,19	3,65	16,00
	1,5	7,88	0,13	7,81	25,56	3,25	1,59
	2	7,75	3,00	6,25	17,75	2,29	38,71
	2,5	4,75	1,75	3,88	11,50	2,42	36,84
	3	3,00	0,38	2,81	7,63	2,54	12,50
	3,5	2,63	0,88	2,19	4,81	1,83	33,33
	4	1,75	0,88	1,31	2,63	1,50	50,00
	4,5	0,88	0,63	0,56	1,31	1,50	71,43
5	0,25	0,00	0,25	0,75	3,00	0,00	
5,5	0,25	0,13	0,19	0,50	2,00	50,00	
6	0,13	0,00	0,13	0,31	2,50	0,00	
6,5	0,13	0,00	0,13	0,19	1,50	0,00	
7	0,13	0,13	0,06	0,06	0,50	100,00	

x = intervalo de idade (semanas); Lx = número médio de sobreviventes no início da idade x; dx = número de indivíduos mortos durante o intervalo x; Ex = estrutura etária; Tx = número total de insetos de idade x além da idade x; ex = esperança de vida para os indivíduos de idade x; e, 100 qx = razão de mortalidade por intervalo de idade.

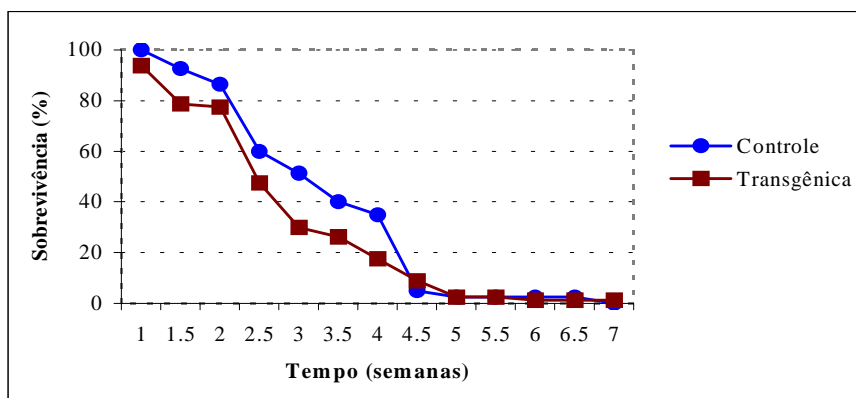


Figura 2. Sobrevivência de *Macrosiphum euphorbiae* (Homoptera: Aphididae) alimentado com berinjelas transgênica e controle. Viçosa, MG, 2000

3.2. Lagartas (Nymphalidae: Lepidoptera)

Das características avaliadas verificou-se ausência de normalidade e de homogeneidade de variância para mortalidade larval, área foliar consumida por dia em centímetros quadrados e área foliar consumida por dia em porcentagem, as quais foram submetidas à transformação dos dados para $\arcseno(x)/100$, $\text{raiz}(x+0,5)$ e $\log(x)$, respectivamente.

Não se observou significância nas características mortalidade larval, mortalidade pupal, duração do período pupal dos efeitos da linhagem da planta, de lagarta e interação entre linhagem de planta e espécie de lagarta, exceto para a duração larval que foi significativamente diferente para as espécies de lagarta. Em relação à área foliar consumida pelas lagartas, observou-se que não houve diferença entre a linhagem da planta e na interação entre linhagem da planta e espécie da lagarta, porém houve diferença em todos os parâmetros avaliados (área foliar total e diária consumida em centímetros quadrados e porcentagem) quando analisada as espécies de lagarta (Tabela 8).

Os dados referentes à mortalidade e duração das fases larvais e pupais de *M. lysimnia* e *M. polymnia* estão resumidos na Tabela 9 e as médias da área foliar consumida por *M. lysimnia* e por *M. polymnia*, em ambos genótipos, estão na Tabela 10.

Tabela 8. Quadrados médio e coeficientes de variação da análise de variância das características avaliadas para *Mechanitis polymnia* e *M. lysimnia* (Lepidoptera: Nymphalidae) em berinjelas transgênicas e controle. Viçosa, MG, 2000

	QM													
	Fontes de Variação						Área foliar consumida							
	GL	Cm ²	%	Total	Diária		Mortalidade da Fase		Duração da fase					
				cm ²	%	GL	Larva	GL	Pupa	GL	Larva	GL	Pupa	
Linhagem da planta (P)	1	45,74	0,36		0,62	0,58x10 ⁻³	1	71,83	1	779,27	1	23,2	1	14,56
Espécie da lagarta (L)	1	40703,56*	34027,24*		106,06*	9,20*	1	1585,55	1	26,45*	1	547	1	0,74
P x L	1	578,95	3,95		0,72	0,42x10 ⁻²	1	53,59	1	114,12	1	61,9	1	4,38
Resíduo	60	2657,43	1452,09		5,39	0,33	26	862,83	5	1470,20	26	102	5	3,63
C. V. (%)		85,87	69,79		70,14	70,18		40,33		63,08		76,19		18,85

* Significativo a p < 0,05
 QM = quadrado médio; GL = graus de liberdade; CV = coeficiente de variação

Tabela 9. Médias \pm erros-padrão da mortalidade e duração da fase larval e pupal de *Mechanitis lysimnia* e *Mechanitis polymnia* (Lepidoptera: Nymphalidae) em berinjelas controle e transgênica. Viçosa, MG, 2000

Característica	Fase	<i>Mechanitis lysimnia</i>		<i>Mechanitis polymnia</i>	
		Controle	Transgênica	Controle	Transgênica
Mortalidade (%)	Larva	81,25 \pm 9,90	70,00 \pm 19,15	93,75 \pm 4,20	92,50 \pm 6,20
	Pupa	47,62 \pm 28,97	73,75 \pm 13,75	58,33 \pm 8,33	70,00 \pm 30,00
Duração (dias)	Larva	20,00 \pm 4,08	15,33 \pm 4,10	8,50 \pm 3,29	9,63 \pm 3,27
	Pupa	9,33 \pm 1,20	10,50 \pm 0,50	8,50 \pm 1,50	12,50 \pm 1,50

Tabela 10. Médias \pm erros-padrão da área foliar consumida por *Mechanitis polymnia* e *M. lysimnia* (Lepidoptera: Nymphalidae) em berinjelas controle e transgênica. Viçosa, MG, 2000

Área foliar consumida	<i>Mechanitis lysimnia</i>		<i>Mechanitis polymnia</i>	
	Controle	Transgênica	Controle	Transgênica
Total (%)	71,81 \pm 8,83	71,44 \pm 7,21	21,88 \pm 11,58	22,57 \pm 13,86
Por dia (%)	28,31 \pm 8,46	22,00 \pm 4,31	5,14 \pm 3,85	3,01 \pm 2,02
Total (cm ²)	83,39 \pm 13,27	75,14 \pm 10,57	22,92 \pm 12,39	27,56 \pm 16,91
Por dia (cm ²)	27,71 \pm 7,35	21,56 \pm 4,55	4,53 \pm 3,08	3,57 \pm 2,27

4. DISCUSSÃO

4.1. Pulgões (Aphididae: Homoptera)

O efeito da espécie de pulgão foi significativo para todas as características estudadas indicando que essas espécies apresentam comportamentos diferentes sobre cada tipo de berinjela estudada. Os efeitos das linhagens da planta quanto às características estudadas também foram significativos, exceto para tempo de geração, indicando que a planta transgênica alterou o ciclo biológico de ambos pulgões (Tabela 1). Pode-se sugerir que o gene exógeno pode ter efeito negativo sobre as características R_0 (Taxa líquida de reprodução), r_m (razão infinitesimal de aumento populacional) e λ (razão finita de aumento populacional), uma vez que as médias encontradas nas plantas transgênicas foram menores do que as encontradas nas plantas controles (Tabelas 2 e 5).

Estes dados estão de acordo com os resultados obtidos SCHULER et al. (2001), em que uma linhagem de nabo expressando o inibidor de cisteína-proteinase (*orizacistatina* I) foi utilizada como alimento para espécies de afídeos e esses cresceram pouco. O gene *orizacistatina* tem sido amplamente utilizado para transformação de grupos de plantas, tendo um espectro de atividade maior que δ -endotoxinas *Bt*.

As tabelas de vida de fertilidade e de esperança são utilizadas em estudos de biologia dos insetos. Foram originalmente desenvolvidas para estudos de populações humanas, sendo adaptadas para investigações de populações naturais de insetos. Essas são de grande valia para a compreensão da dinâmica populacional de uma espécie, pois nessa tabela constam dados essenciais condensados de uma população com relação à taxa de mortalidade, sobrevivência e esperança de vida. Pois dentro de uma população, cada indivíduo apresenta sua própria velocidade de desenvolvimento, longevidade e

fecundidade, sendo tais fatores comumente expressos em termos médios da população (SILVEIRA NETO et al., 1976).

No presente trabalho, observou-se que para *M. persicae*, a longevidade foi maior nas plantas controle (28 dias), que nas plantas transgênicas (24 dias). A esperança inicial também foi maior nas plantas controle (4,24), quando comparadas com as plantas transgênicas (3,32). O risco observado para as fases iniciais e finais em ambos os genótipos são próximos, porém o ciclo de vida do pulgão foi mais curto nas plantas transgênicas (Tabela 4).

Para *Myzus persicae*, RICCI et al. (1999) encontraram variação nos parâmetros da tabela de vida, nas variedades de *Lactuca sativa* estudadas. Os valores obtidos nas plantas controle foram próximos quando comparados com os dados obtidos em couve (*Brassica oleracea*) por ANIL & SINGH (1997), que obtiveram 28,31 dias de tempo de geração (T), taxa infinitesimal de aumento (rm) de 0,153 e por BASTOS et al. (1996) que para T observou 14,33 dias e rm igual a 0,237.

Para *M. euphorbiae*, assim como para *M. persicae*, observou-se que as características rm, Ro e λ das plantas transgênicas foram menores comparativamente às plantas controle (Tabela 5). Para essa espécie não foram encontradas referências na literatura para comparação das respostas obtidas, ainda não foi utilizada para avaliação de transgênicos contendo o gene *orizacistatina*. Contudo, outros genes estão sendo estudados buscando resistência à afídeos. Entre esses pode-se citar o gene *Meu-1*, que conferiu inicialmente resistência à nematóide e a infestações do afídeo *Macrosiphum euphorbiae* (VOS et al., 1998). Ainda, expressão de GNA (*Galanthus nivalis*) em tabaco resultou em proteção adicional contra os afídeos *M. persicae* e, em batata, contra os afídeos *M. persicae* e *Aulacorthum solani* (JOUANIN et al., 1998). Os afídeos representam um grupo de praga não controlada efetivamente pelas plantas transgênicas atuais, e por isso é importante que os efeitos das plantas transgênicas sobre os insetos afidofagos como antagonistas naturais sejam melhor investigados (SCHULER et al., 2001).

4.2. Lagartas (Nymphalidae: Lepidoptera)

Apesar das espécies estudadas serem próximas, suas respostas biológicas às condições experimentais foram diferentes. Essas se alimentaram em quantidades diferentes do limbo foliar e a duração do período larval também foi diferente. Observou-se que planta transgênica não foi efetiva no controle dessa praga (Tabela 8).

Os peptídeos inibidores (PIs) de proteinases são um grupo extremamente resistente à proteólise e são identificados como inibidores de todas as classes de proteinases. Possuem ainda, amplos espectros de ação, e parecem conter propriedades similares aos anticorpos, precipitando proteinases intestinais (CHRISTELLER et al., 1994). O mecanismo de ação baseia-se na inibição competitiva de uma proteinase, via bloqueio de sua atividade proteolítica. De acordo com sua especificidade, esses peptídeos podem ser divididos em quatro classes: serino-, cisteína-, metalo- e, aspartil-proteinases. PIs interferem no desenvolvimento e crescimento das larvas e em alguns casos causam a morte do inseto (JOUANIN et al., 1998). A proteína codificada pelo gene *ozc* (*orizacistatina*) é um exemplo de cisteína-proteinase identificada em arroz, e parece estar envolvida no controle da proteólise enzimática de glutelina sintetizada durante o tempo de florescimento a amadurecimento, devido à expressão coordenada desses mRNAs. Foi encontrada também em sementes de arroz uma cisteína-proteinase que hidroliza eficientemente glutelina e é completamente inibida por uma concentração equimolar de Orizacistatina *in vitro* (ABE et al., 1987).

A presença do gene *orizacistatina* I (OCI) não teve efeito deletério em larvas de ambas espécies de *Mechanitis*, porém segundo LECARDONNEL et al. (1999) batata contendo OCI apresentou efeito deletério na sobrevivência da larva de CPB, e a diferença observada entre as diferentes linhagens transgênicas pode ser relatada a diferenças na expressão de OCI. Cisteína-proteinases são comumente consideradas como sendo o maior tipo de proteases digestivas em Coleoptera, e especialmente no besouro do colorado da batata. Muitos estudos têm sido feitos para a avaliar o impacto das cistatinas no crescimento e desenvolvimento do CPB, e sua possível utilidade como agente para controlar este inseto (LECARDONNEL et al., 1999). Contudo, em Lepidoptera e Diptera a principal classe de proteinases é serina e a obtenção de plantas mais resistentes a Lepidoptera pelo uso de inibidores de serina proteinases de diferentes origens tem sido

reportada (JOUANIN et al., 1998).

Muitas evidências demonstraram que os insetos podem adaptar-se à ingestão de PIs. Lepidoptera e Coleoptera podem superexpressar proteases existentes no intestino, ou induzir a produção de novos tipos insensíveis a PIs introduzidas e sobrepor os efeitos deletérios da ingestão de PIs, pois insetos possuem um conjunto gênico complexo de proteases e esse permite adaptação. Isto pode ser sobrepujado pela expressão de diferentes tipos de PIs, e/ou por aumento da afinidade das PIs introduzidas para as proteases alvo dos insetos. A última estratégia pode ser testada usando PIs modificadas com afinidades otimizadas para proteases. A combinação de PIs inibindo diferentes tipos de proteases ou associação de PIs com outros genes de resistência é uma estratégia que pode ser melhor explorada (JOUANIN et al., 1998).

Alta mortalidade foi encontrada em ambas as lagartas nos nossos experimentos. Segundo PICANÇO (1986) a mortalidade de *Mechanitis polymnia* é altíssima em condições de campo, pois parasitóides e distúrbios fisiológicos acarretam a ocorrência de pupas mal-formadas. Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação sem a presença de parasitóides, e portanto, essa alta mortalidade pode ter ocorrido devido a fatores climáticos não controlados, problemas de adaptabilidade ao hospedeiro, ou ainda, metodologia inadequada de condução dos experimentos.

5. CONCLUSÕES

Foram avaliadas progênies R2 de plantas transgênicas contendo a região codante do gene *orizacistatina* visando verificar a eficácia desse gene no controle de pragas de *Solanum melongena*. Conclui-se que:

- ♦ O ciclo biológico de *Myzus persicae* e *Macrosiphum euphorbiae* foi alterado, sendo que a taxa de reprodução, razão infinitesimal de aumento e razão finita de aumento são menores nas plantas transgênicas.
- ♦ As plantas transgênicas utilizadas nesse estudo não apresentam atividade sobre a mortalidade e duração das fases larvais e pupais de *Mechanitis polymnia* e *M. lysimnia*.
- ♦ Tabelas de vida de fertilidade e esperança são metodologias efetivas para a avaliação de resistência em plantas transgênicas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, K.; EMORI, Y.; KONDO, H.; SUZUKI, K. & ARAI, S. 1987. Molecular cloning of a cysteine proteinase inhibitor of rice (Oryzacystatin). Homology with animal cystatins and transient expression in the ripening process of rice seeds. **The Journal of Biological Chemistry**, **262** (35): 16793-16797.

ANIL, S & SINGH, G. 1997. Life table studies of *Myzus persicae* (Sulzer) (Homoptera: Aphididae) on cauliflower *Brassica oleracea* var. botrytis. **Pest Management in Horticultural Ecosystems**, **3** (2): 75-78.

ARPAIA, S.; MENNELLA, G.; ONOFARO, V.; PERRI, E.; SUNSERI, F. & ROTINO, G. L. 1997. Production of transgenic eggplants (*Solanum melongena* L.) resistant to Colorado Potato Beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say). **Theoretical and Applied Genetics**, **95** (3): 329-334.

BASTOS, C. S.; PICANÇO, M. C.; LEITE, G. L. D. & ARAÚJO, J. M. 1996. Tabelas de fertilidade e de esperança de vida de *Myzus persicae* (Sulzer) (Homoptera: Aphididae) em couve-comum. **Científica**, **24** (1): 187-197

CHRISTELLER, J. T.; LAING, W. A.; MARKWICK, N. P. & BURGESS, E. P. J. 1994. Midgut protease activities in 12 phytophagous lepidopteran larvae: dietary and protease inhibitor interactions. **Insect Biochemical Molecular Biology**, **22**: 735-746.

COLLONNIER, C.; FOCK, I.; KASYAP, V.; ROTINO, G. L.; DAUNAY, M. C.; LIAN, Y.; MARISKA, I. K.; RAJAM, M. V.; SERVAES, A.; DUCREUX, G. & SIHACHAKR, D. 2001. Applications of biotechnology in eggplant. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, **65**: 91-107.

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.

FÁRI, M.; NAGY, I.; CSÁNYI, M.; MITYKÓ, J. & ANDRÁSFALVY, A. 1995. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation and plant regeneration via organogenesis and somatic embryogenesis from cotyledon leaves in eggplant (*Solanum melongena* L. cv. Kecskeméti). **Plant Cell Reports**, **15**: 82-86.

FILGUEIRA, F. A. R. 2000. **Novo manual de Olericultura. Agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. Viçosa, MG. Ed. Universidade Federal de Viçosa: p. 242-245.

GALLO, D.; NAKANO, O.; NETO, S. S.; CARVALHO, R. P. L.; BATISTA, G. C.; FILHO, E. B.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B. & VENDRAMIM, J. D. 1978. **Manual de Entomologia Agrícola**. Piracicaba: Ed. CERES. 649p.

IANNACONE, R.; FIORE, M. C.; MACCHI, A.; GRIECO, P. D.; ARPAIA, S.; PERRONE, D.; MENNELLA, G.; SUNSERI, F. CELLINI, F. & ROTINO, G. L. 1995. Genetic engineering of eggplant (*Solanum melongena* L.). **Acta Horticulturae**, **392**: 227-233.

JOUANIN, L.; BONADÉ-BOTTINO, M.; GIRARD, C.; MORROT, G. & GIBAND, M. 1998. Transgenic plants for insect resistance. **Plant Science**, **131**: 1-11.

LECARDONNEL, A.; CHAUVIN, L.; JOUANIN, L.; BEAUJEAN, A.; PRÉVOST, G. & SANGWAN-NORREEL, B. 1999. Effects of rice cystatin I expression in transgenic potato on Colorado beetle larvae. **Plant Science**, **140**: 87-98.

PICANÇO, M. C. 1986. **Composição, dinâmica e organização da entomofauna do jiloeiro (*Solanum gilo* Raddi)**. Viçosa, MG: UFV, 1986. 129 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa.

RICCI, E. M.; VASICEK, A.; ROSSA, FR. LA. & LA-ROSSA, FR. 1999. Life cycle stages of *Myzus persicae* (Sulzer) (Homoptera: Aphididae) on three lettuce cultivars. Proceedings of the meeting on soil and water conservation technologies for Smallholders in hillside agriculture, March, 1998. **CEIBA**, **40** (1): 69-71.

ROTINO, G. L.; PERRI, E.; ACCIARRI, N.; SUNSERI, F. & ARPAIA, S. 1997. Development of eggplant varietal resistance to insects and diseases via plant breeding. **Advanced Horticultural Science**, **11**: 193-201.

SCHULER, T. H.; DENHOLM, I.; JOUANIN, L.; CLARK, S. J.; CLARK, A. J. & POPPY, G. M. 2001. Population-scale laboratory studies of the effect of transgenic plants on nontarget insects. **Molecular Ecology**, **10**: 1845-1853.

SILVEIRA NETO, S.; NAKANO, O.; BARBIN, D. & VILLA NOVA, N. A. 1976. **Manual de Ecologia de Insetos**. Piracicaba, Ed. Agronômica CERES. 420p.

VOS, P.; SIMONS, G.JESSE, T.; WIJBRANDI, J.; HEINEN, L.; HOGERS. R.; FRIJTERS, A.; GROENEDIJK, J.; DIERGAARDE, P.; REIJANS, M.; FIERENS-ONSTENK, J.; de BOTH, M.; PELEMAN, J.; LIHARSKA, T.; HONTELEZ, J. & ZABEAU, M. 1998. The tomato *Mi-1* gene confers resistance to both root-knot nematodes and potato aphids. **Nature Biotechnology**, **16**: 1365-1369.

CAPÍTULO III

ANÁLISE DA ATIVIDADE GENOTÓXICA INDUZIDA POR BERINJELA TRANSGÊNICA PELO TESTE DE MUTAÇÃO E RECOMBINAÇÃO SOMÁTICAS (SMART) EM ASAS DE *Drosophila melanogaster*

1. INTRODUÇÃO

A berinjela é uma espécie de importância econômica mundial e devido ao seu fácil cultivo *in vitro* e por apresentar respostas satisfatórias, a transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* oferece possibilidade para introduzir genes de interesse em genótipos elite (GURI & SINK, 1988; FÁRI et al., 1995; ROTINO et al., 1997; COLLONNIER et al., 2001).

A transformação genética é a técnica na qual ocorre a inserção de um gene exógeno em um genoma receptor sem o envolvimento de fusão de gametas (BRASILEIRO & DUSI, 1999). Essa não obrigatoriedade de compatibilidade sexual entre os indivíduos é uma das vantagens desta tecnologia. Características de interesse podem ser transferidas entre plantas, animais, bactérias e fungos. O objetivo principal dessa técnica é a introdução de genes sem alterar suas demais características (SILVA-FILHO & FALCO, 2001).

Apesar do aumento no número de pesquisas e produção de transgênicos para comercialização, várias questões relativas à segurança dos transgênicos são levantadas (DUNWELL, 2000). Essas controvérsias em torno dos Organismos Geneticamente Modificados (OGMs) têm sido relatadas na mídia e na literatura científica devido à escassez de informações sobre os possíveis riscos à saúde humana e ao ambiente. Os

OGMs possuem benefícios potenciais tais como ganho de produção, diminuição do uso de insumos agrícolas e aumento na tolerância a estresses ambientais. Entretanto, são levantadas hipóteses dos efeitos deletérios à população de insetos benéficos e a organismos do solo, além de aumento da exposição de humanos, gado e animais selvagens à toxinas, alergênicos e outros compostos. Alguns autores alegam que ainda não há conhecimento científico adequado para prover autorização para utilização de OGMs (CLARK & LEHMAN, 2001). Esses mesmos autores alertam que não se pode generalizar quando a questão é segurança, pois não se pode dizer que os OGMs são seguros o suficiente para o consumo humano baseado em testes de curto tempo de toxicidade aguda, utilizando rato como modelo preditivo para outras espécies, ou ainda, sem testes que determinam a resposta imunológica da população. DOMINGOS (2000) observou que mesmo com tantas questões a serem resolvidas, das aproximadamente 70 publicações atuais sobre segurança dos OGMs, 60 oferecem opiniões e apenas 8 são baseadas em experimentos.

Dessa maneira, tornam-se indispensáveis estudos para determinar o comportamento dos genes inseridos no genoma hospedeiro, a interação do transgênico com o ambiente e os efeitos dos transgênicos consumidos nos diversos animais, dentre estes o homem, de forma a fornecer maiores subsídios quanto à utilização segura ou não desta tecnologia.

Um teste que pode ser utilizado é o SMART (*Somatic Mutation And Recombination Test*) que se baseia nas mutações e recombinações somáticas induzidas ou não por compostos utilizados na alimentação de larvas de *Drosophila melanogaster*. O SMART é baseado no fato que durante o desenvolvimento embriogênico inicial, grupos de células (discos imaginais) originam separadamente uma região do corpo da mosca adulta por mitose, durante o desenvolvimento larval (GUZMÁN-RINCÓN & GRAF, 1995). Se uma alteração genética ocorre em uma das células dos discos imaginais, esta alteração poderá estar presente em todas as células descendentes e formará um clone de células mutantes, que pode ser verificado em apenas uma geração da mosca (GUZMÁN-RINCÓN & GRAF, 1995).

Nesse teste, são detectados na asa o marcador *multiple wing hairs (mwh)*, uma mutação viável completamente recessiva mantida em uma linhagem *mwh* homocigota. A mutação *mwh* está localizada próxima à porção distal do braço esquerdo do cromossomo 3 e, em condição homocigota produz múltiplos tricomas por célula, ao invés de tricomas

únicos normais (GUZMÁN-RINCÓN & GRAF, 1995). O outro marcador recessivo, *flare (flr)*, está localizado no braço esquerdo do cromossomo 3, em uma posição proximal, produz pêlos malformados nas asas com forma de chama. Todos os três alelos mutantes *flr* conhecidos são recessivos zigóticos letais, ou seja, os zigotos homozigóticos recessivos para esta característica não são capazes de atingirem a fase adulta. Em contraste, células homozigotas nos discos imaginais da asa são viáveis e ocasionam manchas mutantes. Devido à letalidade zigótica, alelos *flare* têm sido mantidos em estoques com cromossomos balanceadores carregando inversões múltiplas e um marcador dominante, letal quando homozigoto, *TM3/Bd^r Third multiple 3, beaded-serate* (GUZMÁN-RINCÓN & GRAF, 1995).

Vários compostos e misturas complexas foram avaliados pelo SMART visando verificar efeito genotóxico (hidrato de cloral) ou antigenotóxico (café solúvel, *Moringa oleifera*, ácido ascórbico) (ZORDAM et al., 1994; OLVERA et al., 1994; ABRAHAM & GRAF, 1996; NEPOMUCENO, 1999), pois o DNA e seus precursores estão constantemente submetidos à ação de fatores físicos e químicos, provenientes tanto do meio ambiente quanto do metabolismo do próprio do organismo, que são capazes de influenciar na taxa de mutação (CARVALHO, 1987).

Apesar das vantagens desse teste e das várias substâncias testadas, até o momento não se detectou relatos na literatura do uso do SMART na avaliação dos possíveis efeitos genotóxicos causados por consumo de alimentos transgênicos. Dessa maneira, o objetivo deste trabalho foi verificar se os extratos de berinjela, nos quais foram incorporados os genes das construções pCLDO04541 (contendo as *ORFs* do *neomicina fosfotransferase* e *Sw-5*), pRGG hpt (*higromicina fosfotransferase* e β -*glucuronidase*) e pOZC6 (*orizocistatina*, β -*glucuronidase* e *neomicina fosfotransferase II*), estão associadas à genotoxicidade pelo SMART.

2. MATERIAL E MÉTODOS

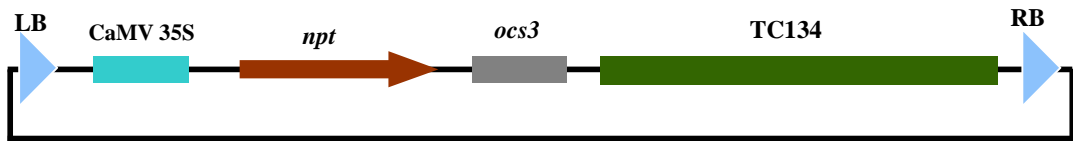
2.1. Material Vegetal

Neste experimento foram utilizados frutos de berinjela (*Solanum melongena*) ‘Embú’. Plantas não transformadas foram adquiridas no comércio local e utilizadas como controle. Plantas transgênicas foram transformadas com os vetores pOZC6 (contendo a região codante dos genes *orizacistatina*, β -glucuronidase e *neomicina fosfotransferase* II), pCLDO 04541 (contendo *Sw-5* e *neomicina fosfotransferase*) e pRGG hpt (*higromicina fosfotransferase* e β -glucuronidase), chamados de OZC, SW5 e HPT, respectivamente (Figura 1).

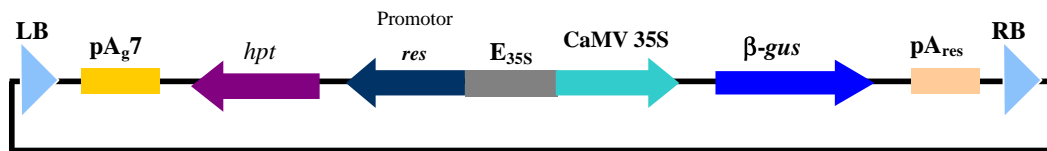
Foram avaliadas plantas R2 obtidas por autofecundação das plantas transgênicas transformadas com o pCLDO 04541, R1 com pOZC6 e R1 com pRGG hpt mediante a alimentação de larvas de *D. melanogaster* cedidas pelo Prof. Mário A. Spanó (Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG), obtidas do banco original do Prof. Ulrich Graf (Institute of Toxicology ETH and University of Zürich, Schwerzenbach, Switzerland).

As plantas foram germinadas em vasos de 5 litros com substrato (Plantmax[®]) e mantidas em casa de vegetação, na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. Os frutos foram coletados, lavados sob água corrente com detergente neutro, pesados, fatiados e congelados à -80°C, para posterior liofilização. Após a desidratação, esses frutos foram novamente pesados e mantidos em sacos plásticos hermeticamente fechados, dentro de um frasco contendo sílica gel, à -80°C. A partir do peso fresco e peso seco foi determinada a quantidade de água necessária para o restabelecimento da umidade inicial.

A) pCLDO 04541



B) pRGG hpt



C) pOZC6

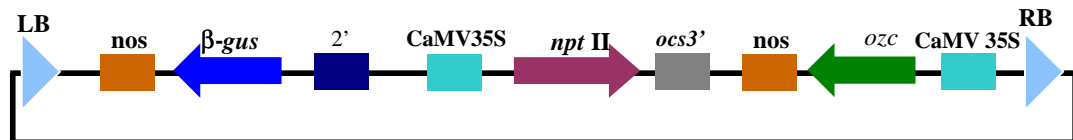


Figura 1. Vetores utilizados na transformação de berinjela ‘Embú’. **A** = Vetor pCLDO 04541; **B** = Vetor pRGG hpt; e **C** = Vetor pOZC6; LB: borda esquerda; CaMV 35S: promotor do RNA 35S do CaMV; *npt*: neomicina fosfotransferase; *ocs3*: sinais de terminação do gene *ocs3*; TC134: clone contendo o gene *Sw-5*; *hpt*: higromicina fosfotransferase; β -*gus*: β -glucuronidase; *nos*: sinais de terminação do gene *nos*; *nptII*: neomicina fosfotransferase II; *ozc*: orizacistatina; RB: borda direita. **A** e **B** (Adaptado de PICOLI, 2000), e **C** (cedida pelo Prof. Istvan Nági, Gödöllő, Hungary).

No laboratório de Citogenética e Mutagênese da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, foi adicionado em cada fruto, separadamente, o dobro da quantidade de água destilada e estéril e esta solução foi triturada e filtrada, para a separação e descarte dos fragmentos mais grosseiros. Foram utilizados 5mL destas soluções.

Para a condução dos experimentos foram obedecidas as normas de biossegurança, com descarte seletivo por incineração de todo o material transgênico envolvido nos experimentos.

2.2. Caracterização das plantas transgênicas

Para identificação das plantas transgênicas foi feita extração de DNA, utilizando folhas de plantas com aproximadamente 5 meses, segundo protocolo descrito por FULTON et al. (1995). Para as reações de amplificação foram utilizados *primers* específicos. Para a construção pOZC6 foi utilizado o *primer*: NPT_r (GCGGTCAGCCCATTCGCCGCC) e NPT_f (TCAGCGCAGGGGCGCCCGGTT) que amplificam o gene *npt II* (*neomicina fosfotransferase II*); para pCLDO 04145: “3331” e “19 pst” que amplificam um fragmento contendo a ORF do gene *Sw-5*; e para pRGG hpt: HPT_r (TCAGCTTCGATGTAGGAGGGCGTG) e HPT_f (CGCTTCTGCGGGCGATTTGTGTACG). Além da PCR, foi realizado o ensaio histoquímico para detecção da atividade enzimática da *β-glucuronidase*, segundo BRASILEIRO & CARNEIRO (1998).

2.3. Teste para detecção de mutações e recombinações somáticas em células de asas de *Drosophila melanogaster* para avaliação do potencial genotóxico de plantas transgênicas

O genoxizal [2 H - 1, 3, 2-Oxazafosforina-2 - amina, N, N-Bis (2-Cloroetil) tetrahydro, 2 - Óxido] (Laboratório Asta Médica Ag., Frankfurt, Alemanha) conhecido como Ciclofosfamida (CPH) foi gentilmente fornecido pelo Dr. Rogério Agenor de Araújo do Hospital do Câncer, Uberlândia, MG. Este agente químico foi dissolvido em água destilada no momento em que foram realizados os tratamentos das larvas. Foram utilizados 5mL de solução com concentração de 5mM.

Foram utilizadas água destilada e estéril e solução de CPH 5mM, como controles negativo e positivo, respectivamente. Além destes, foram feitos tratamentos com extratos dos frutos de berinjela controle e berinjelas transformadas contendo a construção dos vetores pOZC6, pCLDO04541 e pRGG hpt. Estes extratos foram utilizados na alimentação das larvas de *D. melanogaster* no teste para detecção de mutações e recombinações somáticas (SMART) segundo metodologia descrita por GRAF et al. (1984).

Neste teste foram utilizadas as seguintes linhagens de *D. melanogaster*:

- *Multiple wing hairs (mwh)*, com constituição gênica *y; mwh jv*.
- *Flare-3 (flr³)*, com constituição genética *flr³/In(3LR)TM3, ri p^p sep I(3)89Aa bx^{34e} e Bd^s*.
- *ORR; flare-3 (ORR; flr³)*, com constituição genética *ORR; flr³/In(3LR)TM3, ri p^p sep I(3)89Aa bx^{34e} e Bd^s*.

Os estoques de *D. melanogaster* são mantidos em frascos de ¼ de litro contendo meio de cultura para *D. melanogaster* [820mL de água, 25g de fermento de pão (*Saccharomyces cerevisiae*), 11g de ágar, 156g de banana, 1g de nipagin].

Dois cruzamentos foram feitos, sendo que no primeiro, fêmeas virgens da linhagem *flr³/In(3LR)TM3, ri p^p sep I(3)89Aa bx^{34e} e Bd^s* foram cruzadas com machos *mwh jv*, cruzamento padrão (*Standard cross - ST*); e no segundo, fêmeas virgens *ORR; flr³/In(3LR)TM3, ri p^p sep I(3)89Aa bx^{34e} e Bd^s* foram cruzadas com machos *mwh jv*, cruzamento de alta bioativação (*High Bioactivation cross - HB*) (GUZMÁN-RINCÓN & GRAF, 1995). De ambos cruzamentos foram obtidos os descendentes marcador trans-heterozigoto (MH: *mwh + / + flr³*) e balanceador heterozigoto (BH: *mwh + / + TM3, Bd^s*).

Ovos foram coletados por um período de 8 horas em frascos contendo uma base sólida de ágar (3% de ágar em água) e uma camada de fermento de pão (*S. cerevisiae*) suplementado com sacarose, quantidade suficiente para que ferva três vezes. Após 72 ± 4 horas, larvas de 3º estágio foram lavadas com água corrente e coletadas com auxílio de uma peneira de malha fina. Grupos de aproximadamente 100 larvas de ambos os genótipos foram transferidas para frascos contendo 1,5g de purê de batata instantâneo (Yoki Alimentos S.A.) e 5mL de extratos de berinjelas controle e transgênica, e os devidos controles negativo (água destilada estéril) e positivo (solução de CPH 5mM).

As larvas de 3º estágio foram submetidas a um tratamento crônico por um período de aproximadamente 48 horas (Figura 2). As moscas adultas emergentes das pupas foram

coletadas e fixadas em etanol 70%. As asas foram extraídas dos indivíduos adultos, estendidas e fixadas sobre lâminas com solução de Faure (GRAF et al., 1984).

A análise das lâminas foi realizada sob microscópio óptico, aumento de 400x. O número, os tipos, a posição e o tamanho das manchas encontradas nas asas foram registrados. Aproximadamente 24.800 células foram analisadas por asa. Manchas simples pequenas ou grandes, *multiple wing hairs* ou *flare*³, e gêmeas *multiple wing hairs* e *flare*³ foram os fenótipos obtidos e foram produzidos por diversos tipos de mutações, assim como por recombinação mitótica.

O experimento foi conduzido em duas etapas. Na primeira etapa (Experimento I) foi utilizado um fruto de cada planta, sendo um controle e três plantas transformadas (HPT-1, OZC-2 e SW5-3). Na segunda etapa (Experimento II) foram repetidos estes tratamentos e acrescentado mais um fruto de plantas provenientes de eventos independentes de transformação, contendo os genes *Sw-5* e *orizacistatina*. O fruto OZC-2 foi novamente diluído a uma concentração de 25%. Além desses tratamentos, no Experimento II, foram aquecidos os mesmos frutos (HPT-1, OZC-2 e SW5-3) da primeira etapa. O aquecimento foi conduzido à 45°C por 30 minutos, em banho-maria.

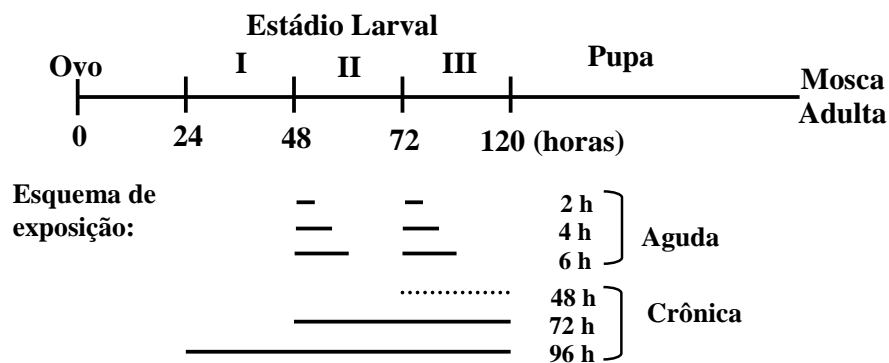


Figura 2. Esquemas de exposição aguda e crônica, de larvas de *Drosophila melanogaster* dos cruzamentos ST e HB, com berinjelas controle e transgênica (contendo as construções dos vetores pCLDO04541, pRGG hpt e pOZC6), controle positivo (CPH) e controle negativo (água destilada estéril):..... Tratamento crônico utilizado.

A avaliação da atividade genotóxica dos extratos de berinjela, as frequências de manchas das séries tratadas foram comparadas com o controle negativo. Sendo que a

análise estatística foi feita de acordo com o teste do qui-quadrado (χ^2) para proporções, bicaudal, em nível de significância de 5%, conforme descrito por FREI & WÜRGLER (1988).

2.4. Microscopia eletrônica de varredura

Asas de *Drosophila melanogaster* foram coletadas, fixadas em etanol 70%, e pós-fixadas com tetróxido de ósmio a 1%, por cerca de 1 hora e 30 minutos, preparados com tampão fosfato de potássio, para serem analisadas ao microscópio eletrônico de varredura. Após a desidratação do material em série etanólica, foi feita a secagem em ponto crítico, utilizando CO₂ em equipamento Balzers (modelo CPD 020), com fixação em suporte próprio, com fita adesiva dupla face e cola de carbono. Para a cobertura metálica com ouro, foi utilizado o processo de pulverização catódica em equipamento de Balzers (Modelo FDU 010). A observação e a documentação fotográfica foram feitas com o uso de microscópio de varredura Jeol (JSM T200), a 15 KV, do departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

2.5. Identificação das bactérias isoladas dos frutos de berinjela utilizados no SMART

Frações de todos os frutos liofilizados das plantas transgênicas e controle utilizados no SMART, foram mantidos à -80°C e posteriormente utilizados para detecção de *Agrobacterium tumefaciens*. Os quais foram rehidratados com água destilada e estéril, e essas suspensões plaqueadas sob condições estéreis e avaliadas pelo teste Ketolactose (BERNAERTS, 1963).

3. RESULTADOS

Alimentação crônica por 48h de larvas derivadas dos cruzamentos padrão (ST) e de alta bioativação (HB) foi realizada simultaneamente, de modo que as larvas obtidas de ambos cruzamentos foram tratadas sob condições idênticas e repetidas em experimentos independentes.

Em cada experimento foram testados frutos liofilizados de berinjela controle (não transformada) e transgênicas HPT, OZC e SW5, frutos 1, 2, 3, 4 e 5 chamados respectivamente de HPT-1, OZC-2, SW5-3, OZC-4 e SW5-5. No Experimento I foi testado um fruto de cada transgênico (HPT-1, OZC-2 e SW5-3). No Experimento II foram repetidos esses frutos *in natura* e sob aquecimento e, acrescentados mais um fruto OZC e um SW5, chamados de OZC-4 e SW5-5. Além desses, diluiu-se o extrato do fruto OZC-2 a uma concentração de 25%. Cada experimento também continha um controle positivo (CPH) e um negativo (água).

Foram observados os fenótipos mutantes nas asas de *Drosophila melanogaster* por análise em microscópio fotônico (Figura 3) e documentados por eletromicrografia (Figura 4).

As frequências de manchas observadas nos descendentes de *D. melanogaster* tratados com extrato de berinjela *in natura* no Experimento I são demonstrados na tabela 1 e o Experimento II na tabela 2. Nessa está descrito os tratamentos realizados com larvas obtidas por meio dos cruzamentos ST e HB, a concentração do extrato, o número de asas analisadas, bem como o número de manchas encontradas por asa, e o tipo: manchas simples pequenas (uma ou duas células), manchas simples grandes (mais de duas células), manchas gêmeas e o número total de manchas.

Os descendentes do cruzamento ST do Experimento I tratados com CPH

apresentaram para as frequências de manchas grandes simples, resultado positivo; para as manchas gêmeas, inconclusivo e, para as manchas pequenas simples e para número total de manchas, fraco positivo, quando comparado com as frequências observadas no controle negativo. Para Berinjela controle houve resultados inconclusivos para manchas pequenas simples e número total de manchas, e, negativos para manchas grandes simples e manchas gêmeas. Enquanto que para HPT-1 foram verificados resultados inconclusivos para todas as frequências, exceto para número total de manchas, que foi positivo. Para OZC-2 todos apresentaram resultados negativos; para SW5-3 as frequências de manchas grandes simples e manchas gêmeas foram inconclusivas, e as manchas pequenas simples e número total de manchas apresentaram resultados positivos. Já para os descendentes do cruzamento HB, tratados com CPH, foram obtidos resultados positivos para todas as frequências analisadas; todos os tratamentos (Berinjelas HPT-1, OZC-2 e SW5-3) apresentaram resultados negativos.

No cruzamento ST do Experimento II, os descendentes tratados com CPH apresentaram resultados positivos para manchas pequenas simples e número total de manchas, e inconclusivos para manchas grandes simples e manchas gêmeas. Nos tratamentos, todos apresentaram resultados negativos para manchas pequenas simples, manchas grandes simples e número total de manchas. Para manchas gêmeas, os tratamentos berinjela HPT-1 e berinjela OZC-4 apresentaram resultados negativos e todos os outros, inconclusivos. No cruzamento HB, os descendentes tratados com CPH apresentaram resultados positivos para manchas pequenas simples, manchas grandes simples e número total de manchas, enquanto que para manchas gêmeas o resultado foi inconclusivo. Em todos os outros tratamentos, manchas pequenas simples e número total de manchas foram negativos. Manchas grandes simples foi negativo para berinjela controle, positivo para berinjela HPT-1 e berinjela OZC-2 e inconclusivo para todos os outros. Manchas gêmeas apresentaram resultado inconclusivo para todos os tratamentos, exceto para SW5-5, o qual foi negativo.

As frequências de manchas encontradas em asas de *D. melanogaster* tratadas com CPH, berinjelas controle e transformadas (HPT-1, OZC-2 e SW5-3), dos descendentes dos cruzamentos ST e HB, relativas ao Experimento I (Figuras 5 e 6) e ao Experimento II (Figuras 7 e 8) são apresentadas. Verificou-se elevadas frequências de manchas simples pequenas (1 a 2 células) em todos os tratamentos de ambos cruzamentos dos Experimentos I e II.

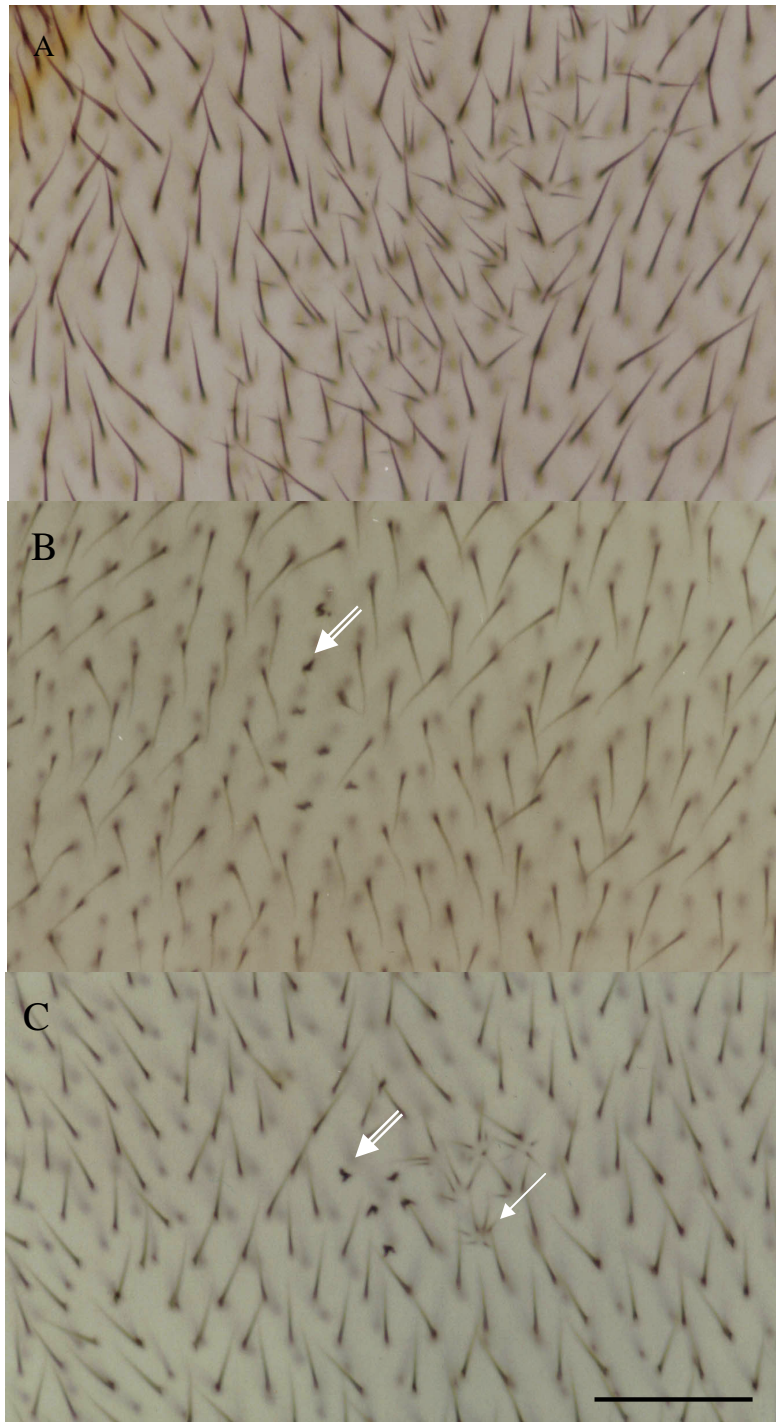


Figura 3. Fotomicrografias de asa de *Drosophila melanogaster* ao microscópio óptico. **A** – Fenótipo de uma mancha simples, com pêlos *multiple wing hairs* (*mwh*); **B** – fenótipo de uma mancha simples, com pêlos *flare – 3* (*flr³*); **C** – Fenótipo de uma mancha gêmea, com pêlos *multiple wing hairs* (seta simples) e *flare-3* (seta dupla. Barra = 50 μ m).

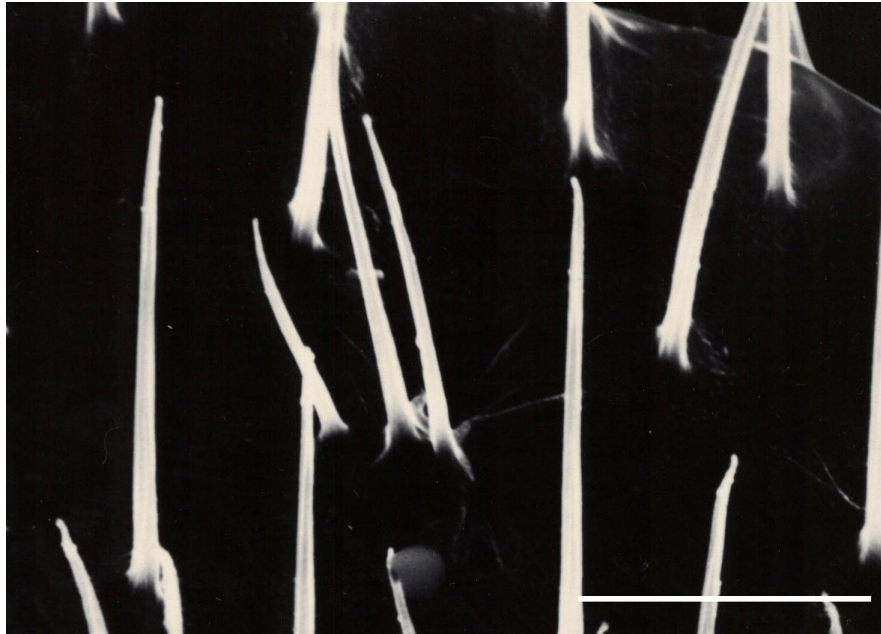


Figura 4. Micrografias eletrônica de varredura da asa de *Drosophila melanogaster*. Fenótipo de uma mancha *multiple wing hairs (mwh)*, com uma célula afetada. Barra = 10 μ m.

Tabela 1. Frequência de manchas mutantes observadas nos descendentes MH ($mwh^{+}/+flr^3$) de *Drosophila melanogaster*, dos cruzamentos ST e HB, tratados com berinjelas geneticamente modificadas *in natura* (Experimento D).

Tratamento	Número de moscas		Número de manchas por asa (número de manchas) * diagnóstico estatístico			Total
	Fruto	Concentração	Pequena simples (1-2cels.) (m=2)	Grande simples (> 2cels.) (m=5)	Gêmeas (m=5)	
Cruzamento ST						(m=2)
Controle (água)			0,167 (10)	0,033 (02)	0,000 (00)	0,200 (12)
Controle positivo (CPH)		5mM	0,683 (41) f	0,167 (10) +	0,050 (03) i	0,900 (54) f
Berinjela controle		50%	0,233 (14) i	0,000 (00) -	0,000 (00) -	0,233 (14) i
Berinjela HPT	1	50%	0,300 (18) i	0,083 (05) i	0,017 (01) i	0,400 (24) +
Berinjela OZC	2	50%	0,117 (07) -	0,017 (01) -	0,000 (00) -	0,133 (08) -
Berinjela SW5	3	50%	0,367 (22) +	0,050 (03) i	0,017 (01) i	0,433 (26) +
Cruzamento HB						
Controle (água)			0,583 (35)	0,083 (05)	0,017 (01)	0,683 (41)
Controle positivo (CPH)		5mM	1,267 (76) +	0,350 (21) +	0,167 (10) +	1,783 (107) +
Berinjela controle		50%	0,517 (31) -	0,050 (03) -	0,000 (00) -	0,567 (34) -
Berinjela HPT	1	50%	0,450 (27) -	0,067 (04) -	0,017 (01) -	0,533 (32) -
Berinjela OZC	2	50%	0,400 (24) -	0,117 (07) -	0,000 (00) -	0,517 (31) -
Berinjela SW5	3	50%	0,350 (21) -	0,017 (01) -	0,017 (01) -	0,383 (23) -

* Diagnóstico estatístico de acordo com FREI e WÜRGLER (1988): + = positivo; - = negativo; i = inconclusivo; f = fraco multiplicador. Nível de significância: $\alpha = \beta = 0.05$.

Tabela 2. Frequência de manchas mutantes observadas nos descendentes MH ($mwh^{+}/+flr^{3}$) de *Drosophila melanogaster*, dos cruzamentos ST e HB, tratados com berinjelas geneticamente modificadas *in natura* (Experimento II).

Tratamento	Número de moscas		Número de manchas por asa (número de manchas) * diagnóstico estatístico			
	fruta	Concentração	Pequena simples (1-2celes.) (m=2)	Grande simples (> 2celes.) (m=5)	Gêmeas (m=5)	Total (m=2)
Cruzamento ST						
Controle (água)			0,267 (16)	0,067 (04)	0,000 (00)	0,333 (20)
Controle positivo (CPH)		5mM	0,683 (41) +	0,167 (10) i	0,050 (02) i	0,900 (54) +
Berinjela controle		50%	0,163 (13) -	0,038 (03) -	0,013 (01) i	0,213 (17) -
Berinjela HPT	1	50%	0,212 (14) -	0,015 (01) -	0,000 (00) -	0,227 (15) -
Berinjela OZC	2	50%	0,267 (16) -	0,033 (02) -	0,050 (03) i	0,350 (21) -
Berinjela SW5	3	50%	0,267 (16) -	0,067 (04) -	0,017 (01) i	0,350 (21) -
Berinjela OZC	4	50%	0,167 (10) -	0,000 (00) -	0,000 (00) -	0,167 (10) -
Berinjela SW5	5	50%	0,183 (11) -	0,017 (01) -	0,017 (01) i	0,217 (13) -
Berinjela OZC	1	25%	0,224 (13) -	0,034 (02) -	0,017 (01) i	0,276 (16) -
Cruzamento HB						
Controle (água)			0,650 (26)	0,025 (01)	0,000 (00)	0,675 (27)
Controle positivo (CPH)		5mM	1,447 (55) +	0,237 (09) +	0,026 (01) i	1,711 (65) +
Berinjela controle		50%	0,229 (11) -	0,021 (01) -	0,042 (02) i	0,292 (14) -
Berinjela HPT	1	50%	0,517 (31) -	0,183 (11) +	0,017 (01) i	0,717 (43) -
Berinjela OZC	2	50%	0,500 (30) -	0,183 (11) +	0,017 (01) i	0,700 (42) -
Berinjela SW5	3	50%	0,700 (28) -	0,050 (02) i	0,025 (01) i	0,775 (31) -
Berinjela OZC	4	50%	0,340 (17) -	0,080 (04) i	0,040 (02) i	0,460 (23) -
Berinjela SW5	5	50%	0,466 (28) -	0,150 (09) i	0,000 (00) -	0,617 (37) -
Berinjela OZC	1	25%	0,450 (27) -	0,133 (08) i	0,017 (01) i	0,600 (36) -

* Diagnóstico estatístico de acordo com FREI e WÜRGLER (1988): + = positivo; - = negativo; i = inconclusivo; f = fraco positivo. m = fator multiplicador. Nível de significância: $\alpha = \beta = 0.05$.

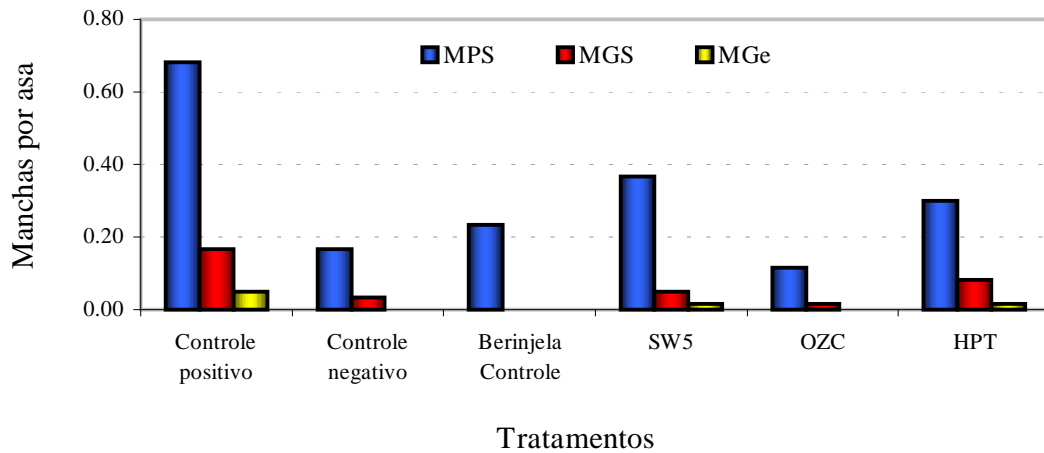


Figura 5. Frequências de manchas observadas em asas dos descendentes MH de *Drosophila melanogaster* (cruzamento padrão - ST) tratadas com berinjelas geneticamente modificadas (Experimento I). MPS = manchas pequenas e simples; MGS = manchas grandes e simples; MGe = manchas gêmeas.

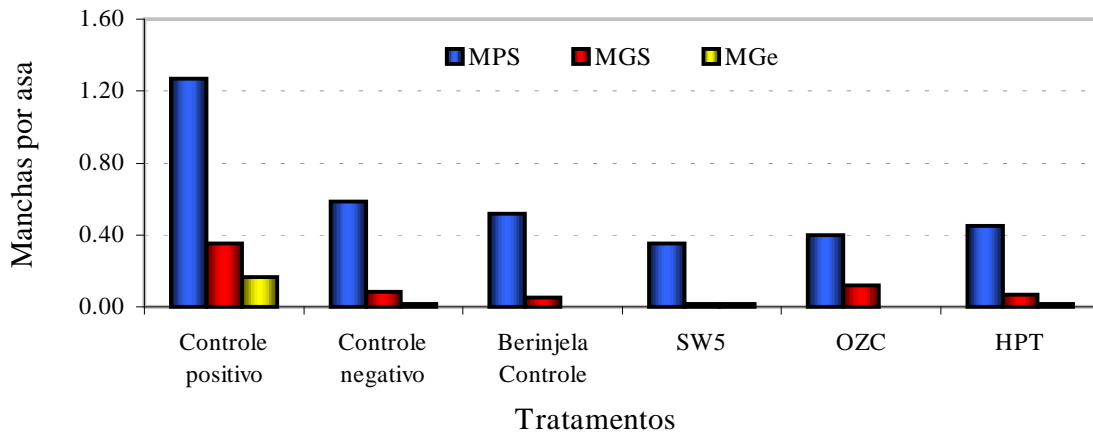


Figura 6. Frequências de manchas observadas em asas dos descendentes MH de *Drosophila melanogaster* (cruzamento de alta bioativação - HB) tratadas com berinjelas geneticamente modificadas (Experimento I). MPS = manchas pequenas e simples; MGS = manchas grandes e simples; MGe = manchas gêmeas.

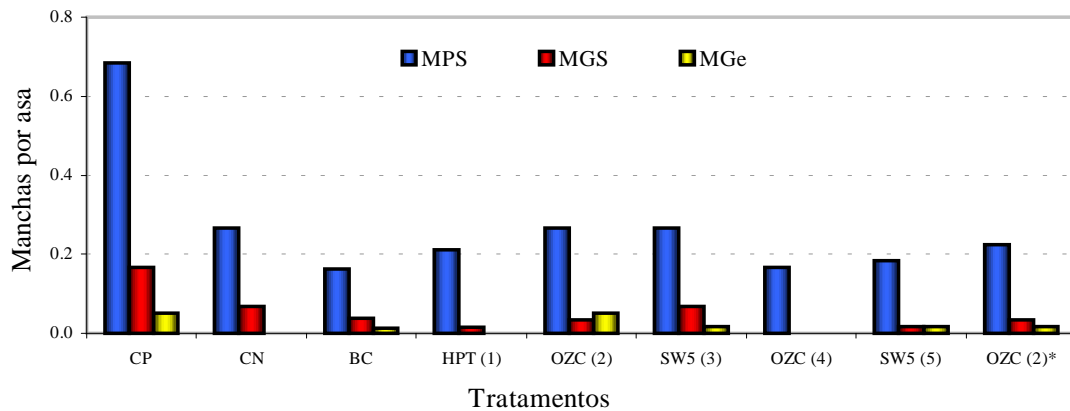


Figura 7. Frequências de manchas observadas em asas dos descendentes MH de *Drosophila melanogaster* (cruzamento padrão - ST) tratadas com berinjelas geneticamente modificadas (Experimento II). MPS = manchas pequenas e simples; MGS = manchas grandes e simples; MGe = manchas gêmeas; CP = controle positivo; CN = controle negativo; BC = berinjela controle; * tratamento com concentração final de igual a 25% da concentração inicial.

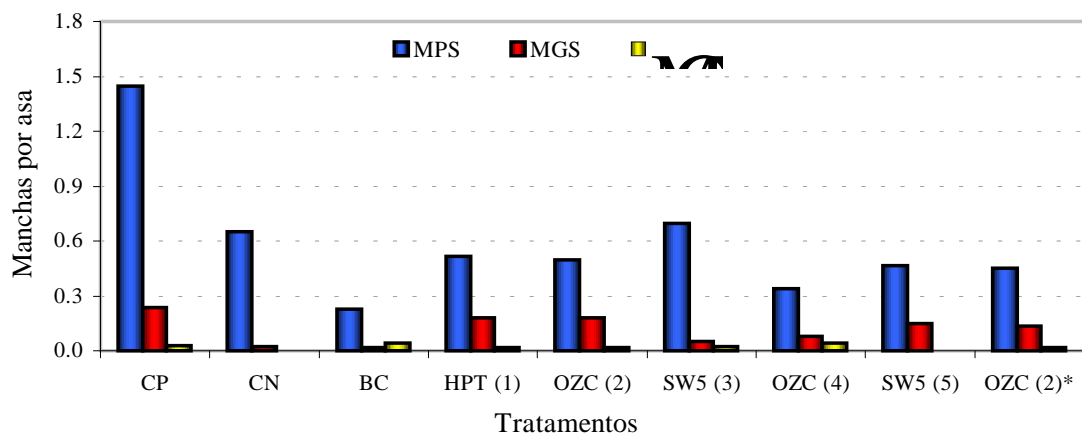


Figura 8. Frequências de manchas observadas em asas de *Drosophila melanogaster* (cruzamento de alta bioativação - HB) tratadas com berinjelas geneticamente modificadas (Experimento II). MPS = manchas pequenas e simples; MGS = manchas grandes e simples; MGe = manchas gêmeas; CP = controle positivo; CN = controle negativo; BC = berinjela controle; * tratamento com concentração final de igual a 25% da concentração inicial.

Os dados foram checados para homogeneidade de variância por qui-quadrado (χ^2) e os dois experimentos foram agrupados. As frequências das manchas encontradas estão demonstradas na tabela 3. De acordo com as frequências de manchas mostradas, verifica-se que nos descendentes MH tratados com CPH, do cruzamento ST, houve aumento significativo quando comparados com o controle negativo; este tratamento apresentou resultado positivo para manchas grandes simples e número total de manchas, enquanto manchas pequenas simples e manchas gêmeas o resultado foi fraco positivo. Em todos os outros tratamentos, manchas pequenas simples e número total de manchas foram negativos, à exceção para HPT, que apresentou resultado inconclusivo. Para manchas grandes simples apresentou resultado negativo e, para manchas gêmeas, inconclusivo em todos os tratamentos. Nos descendentes do cruzamento HB, tratados com CPH todos as características analisadas apresentaram resultados positivos. Para manchas pequenas e simples, e número total de manchas todos os tratamentos foram negativos. Manchas grandes simples nos tratamentos Berinjela controle e HPT foram negativos, SW5 inconclusivo, e OZC apresentou aumento no número de manchas encontradas (resultado positivo). Para manchas gêmeas OZC encontrou-se resultado negativo, e Berinjela controle, HPT e SW5, resultados inconclusivos.

As manchas podem ser agrupadas por tamanho indicando o número de divisões que as células sofreram, essas podem ser separadas nas classes: 1; 2; 3 a 4; 5 a 8; 9 a 16; 17 a 32; 33 a 64, 65 a 128 e maiores que 128. Sendo que, estes números indicam o número de células mutantes (GRAF et al., 1984). As figuras 9, 10, 11 e 12 indicam as classes encontradas nos cruzamentos ST e HB em ambos experimentos. Pode-se observar que houve uma predominância de manchas nas frequências de manchas pequenas em todos os tratamentos.

Tabela 3. Frequência de manchas mutantes observadas nos descendentes MH (*mwh +/+flr³*) de *Drosophila melanogaster*, dos cruzamentos ST e HB, tratados com berinjelas geneticamente modificadas *in natura* (Somatória dos dados dos Experimentos I e II).

Tratamento	Número de moscas		Número de manchas por asa (número de manchas) * diagnóstico estatístico			
	fruto	concentração	Pequena simples (1-2cels.) (m=2)	Grande simples (> 2cels.) (m=5)	Gêmeas (m=5)	Total (m=2)
Cruzamento ST						
Controle (água)			0.217 (26)	0.050 (06)	0.000 (00)	0.267 (32)
Controle positivo (CPH)		5mM	0.683 (82) f	0.167 (20) +	0.050 (06) +	0.900 (108) f
Berinjela controle		50%	0.193 (27) -	0.021 (03) -	0.007 (01) i	0.221 (31) -
Berinjela HPT	1	50%	0.254 (32) i	0.048 (06) -	0.007 (01) i	0.309 (39) i
Berinjela OZC	2	50%	0.192 (23) -	0.025 (03) -	0.025 (03) i	0.242 (29) -
Berinjela SW5	3	50%	0.317 (38) -	0.058 (07) -	0.017 (02) i	0.392 (47) -
Cruzamento HB						
Controle (água)			0.610 (61)	0.060 (06)	0.010 (01)	0.680 (68)
Controle positivo (CPH)		5mM	1.337 (131) +	0.306 (30) +	0.112 (11) +	1.755 (172) +
Berinjela controle		50%	0.389 (42) -	0.037 (04) -	0.019 (02) i	0.444 (48) -
Berinjela HPT	1	50%	0.483 (58) -	0.125 (15) i	0.017 (02) i	0.625 (75) -
Berinjela OZC	2	50%	0.450 (54) -	0.150 (18) +	0.008 (01) -	0.608 (73) -
Berinjela SW5	3	50%	0.490 (49) -	0.030 (03) -	0.020 (02) i	0.540 (54) -

* Diagnóstico estatístico de acordo com FREI e WÜRGLER (1988): + = positivo; - = negativo; i = inconclusivo; f = fraco multiplicador. m = fator multiplicador. Nível de significância: $\alpha = \beta = 0.05$.

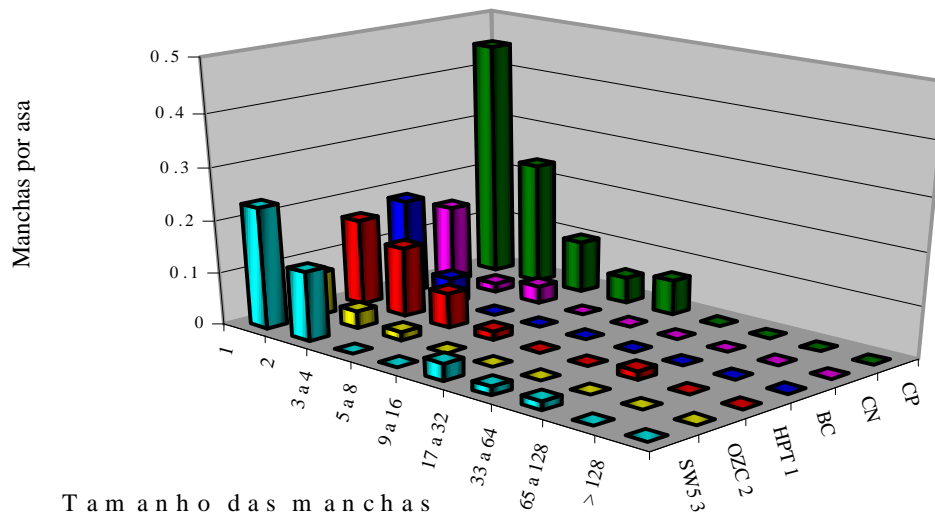


Figura 9. Distribuição de manchas observadas em asas de *Drosophila melanogaster* (cruzamento padrão - ST) tratadas com berinjelas geneticamente modificadas (Experimento I). CP = controle positivo; CN = controle negativo; BC = berinjela controle; HPT-1 = fruto da planta transgênica HPT; OZC-2 = fruto da planta transgênica OZC; e, SW5-3 = fruto da planta transgênica SW5.

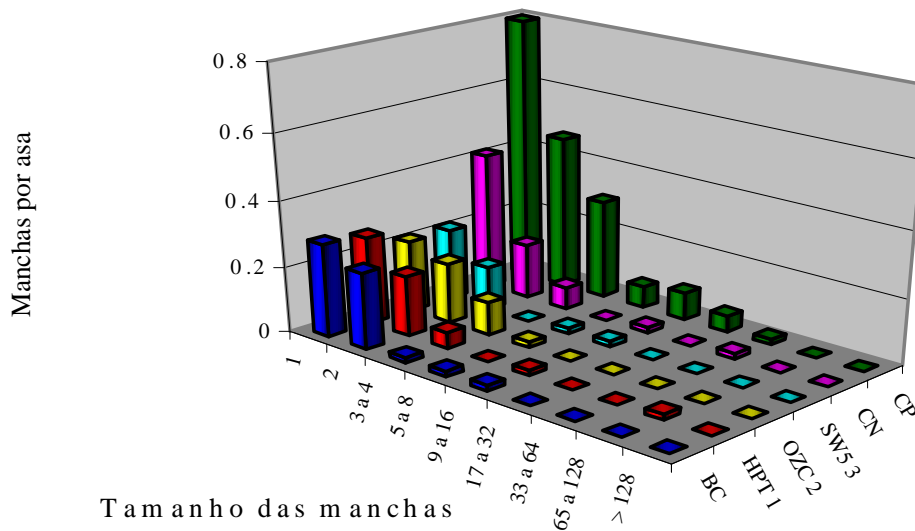


Figura 10. Distribuição de manchas observadas em asas de *Drosophila melanogaster* (cruzamento de alta bioativação - HB) tratadas com berinjelas geneticamente modificadas (Experimento I). CP = controle positivo; CN = controle negativo; BC = berinjela controle; HPT-1 = fruto da planta transgênica HPT; OZC-2 = fruto da planta transgênica OZC; e, SW5-3 = fruto da planta transgênica SW5.

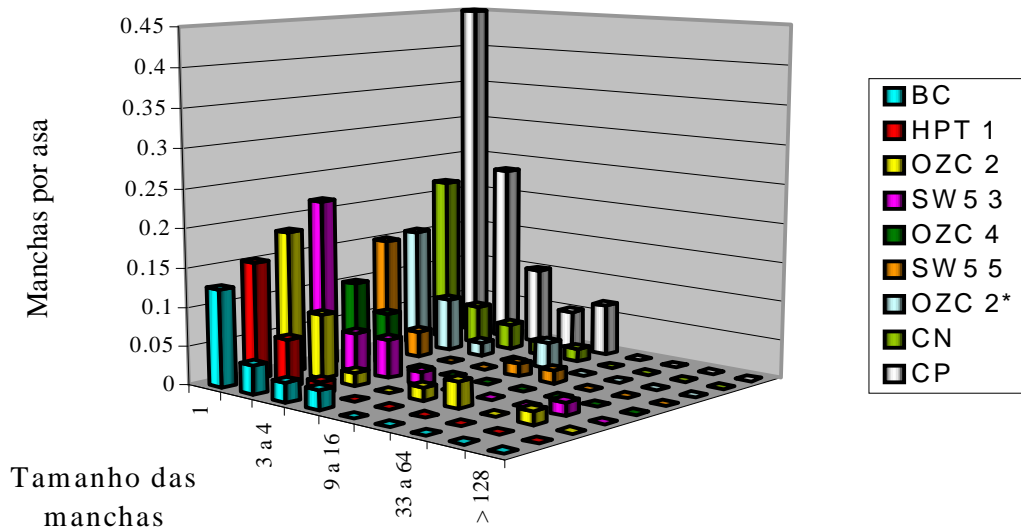


Figura 11. Distribuição de manchas observadas em asas de *D. melanogaster* (cruzamento padrão - ST) tratadas com berinjelas geneticamente modificadas (Experimento II). CP = controle positivo; CN = controle negativo; BC = berinjela controle; HPT = fruto da planta transgênica HPT; OZC = fruto da planta transgênica OZC; e, SW5 = fruto da planta transgênica SW5. * tratamento com concentração final igual a 25% da concentração inicial.

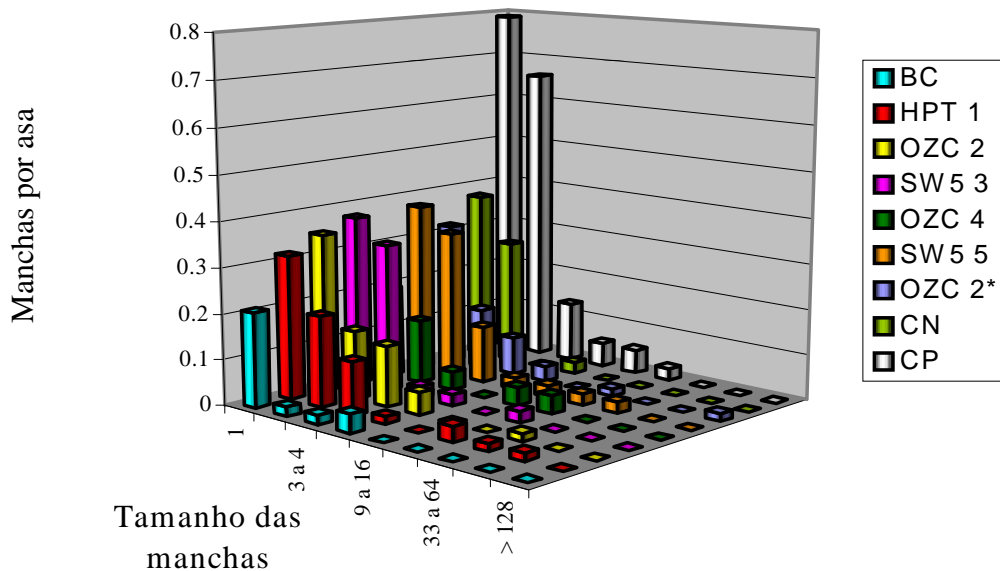


Figura 12. Distribuição de manchas observadas em asas de *D. melanogaster* (cruzamento de alta bioativação - HB) tratadas com berinjelas geneticamente modificadas (Experimento II). CP = controle positivo; CN = controle negativo; BC = berinjela controle; HPT = fruto da planta transgênica HPT; OZC = fruto da planta transgênica OZC; e, SW5 = fruto da planta transgênica SW5. * tratamento com concentração final igual a 25% da concentração inicial.

Para os frutos aquecidos (Experimento II), as frequências de manchas observadas nos descendentes de *D. melanogaster* estão demonstrados na tabela 4. Os descendentes do cruzamento ST do experimento II tratados com berinjela controle e OZC-2, apresentaram resultados inconclusivos para manchas pequenas simples e número total de manchas, e, negativos para manchas grandes simples e manchas gêmeas. Enquanto que, para a berinjela HPT-1 e SW5-3 foram verificados resultados negativos para todas as frequências. Os descendentes do cruzamento HB, as frequências de manchas pequenas simples e manchas totais todos os tratamentos apresentaram resultados negativos. As frequências de manchas grandes simples, berinjela controle foi negativo, OZC-2 e SW5-3 foram inconclusivos e HPT-1 positivo. Todos os tratamentos apresentaram resultados negativos relativos a frequência de manchas gêmeas, exceto OZC-2 que foi inconclusivo.

As figuras 13 e 14 apresentam as frequências de manchas encontradas em asas de *D. melanogaster* tratadas com berinjelas controle e transformadas (HPT-1, OZC-2 e SW5-3) aquecidas à 45°C, dos descendentes dos cruzamentos ST e HB, respectivamente, do Experimento II.

Tabela 4. Frequência de manchas mutantes observadas nos descendentes MH ($mwh +/ +flr^3$) de *Drosophila melanogaster*, dos cruzamentos ST e HB, tratados com berinjelas geneticamente modificadas aquecidas (Experimento II).

Tratamento	Número de moscas		Manchas por asa (número de manchas) * diagnóstico estatístico			Total	
	fruta	concentração	Pequena simples (1-2 cels.) m=2	Grande simples (> 2cels.) (m=5)	Gêmeas (m=5)		
Cruzamento ST							
Controle (água)			30	0,267 (16)	0,067 (04)	0,000 (00)	0,333 (20)
Controle positivo (CPH)		5mM	30	0,683 (41) +	0,167 (10) i	0,050 (02) i	0,900 (54) +
Berinjela (controle)		50%	10	0,250 (05) -	0,100 (02) i	0,000 (00) -	0,350 (07) i
Berinjela HPT	1	50%	10	0,100 (02) -	0,050 (01) -	0,000 (00) -	0,150 (03) -
Berinjela OZC	2	50%	10	0,250 (05) -	0,200 (04) i	0,000 (00) -	0,450 (09) i
Berinjela SW5	3	50%	10	0,200 (04) -	0,050 (01) -	0,000 (00) -	0,250 (05) -
Cruzamento HB							
Controle (água)			20	0,650 (26)	0,025 (01)	0,000 (00)	0,675 (27)
Controle positivo (CPH)		5mM	19	1,447 (55) +	0,237 (09) +	0,026 (01) i	1,711 (65) +
Berinjela (controle)		50%	10	0,250 (05) -	0,000 (00) -	0,000 (00) -	0,250 (05) -
Berinjela HPT	1	50%	10	0,250 (05) -	0,200 (04) +	0,000 (00) -	0,450 (09) -
Berinjela OZC	2	50%	10	0,350 (07) -	0,050 (01) i	0,050 (01) i	0,450 (09) -
Berinjela SW5	3	50%	10	0,150 (03) -	0,050 (01) i	0,000 (00) -	0,200 (04) -

* Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würigler (1988): + = positivo; - = negativo; i = inconclusivo; f = fraco positivo. m = fator multiplicador. Nível de significância: $\alpha = \beta = 0.05$.

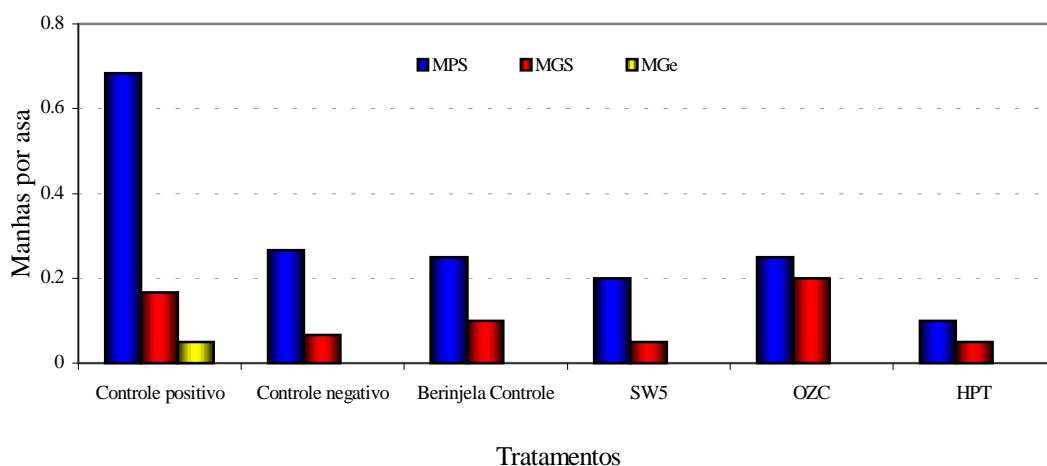


Figura 13. Frequências de manchas observadas em asas de *Drosophila melanogaster* (cruzamento padrão - ST) tratadas com berinjelas geneticamente modificadas aquecidas à 45°C (Experimento II). MPS = manchas pequenas e simples; MGS = manchas grandes e simples; MGe = manchas gêmeas.

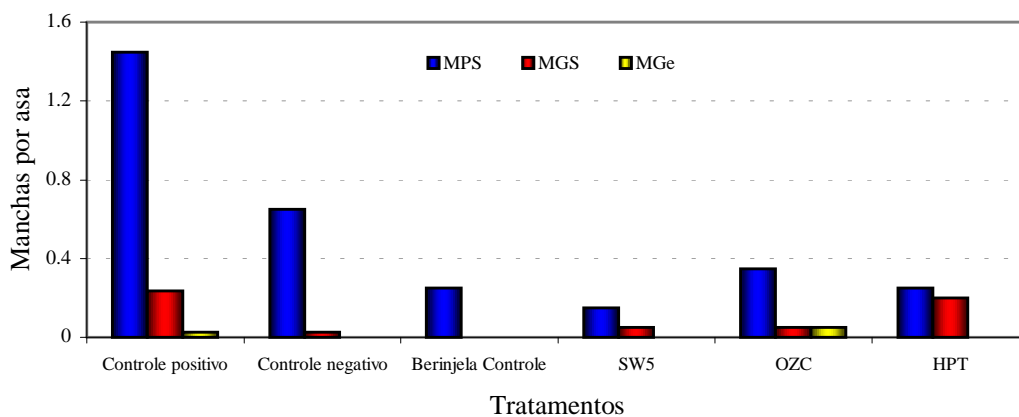


Figura 14. Frequências de manchas observadas em asas de *Drosophila melanogaster* (cruzamento de alta bioativação - HB) tratadas com berinjelas geneticamente modificadas aquecidas à 45°C (Experimento II). MPS = manchas pequenas e simples; MGS = manchas grandes e simples; MGe = manchas gêmeas.

Dos tratamentos HPT-1 e SW5-3 do experimento I, a progênie marcadora-heterozigota, apresentou para número total de manchas aumento estatisticamente significativo. Para determinar por comparação o tipo de atividade genotóxica das berinjelas transgênicas, a progênie balanceadora-heterozigota foi analisada (Tabela 5, Figura 15). Observa-se que em todos os tratamentos encontrou-se uma porcentagem alta de recombinação, pois a progênie marcadora-heterozigota apresentou uma frequência de manchas 80,56% no controle positivo, 43,75% no HPT e de 82,68% SW5 maior que a progênie balanceadora-heterozigota, onde recombinação é um evento totalmente eliminado.

Todos os seis frutos (Berinjela controle, HPT-1; OZC-2, SW5-3, OZC-4, SW5-5) utilizados nos experimentos foram macerados e plaqueados para isolar bactérias, sendo que, desses foram isoladas 10 colônias de bactérias, dos frutos SW5-3 e SW5-5. Dessas, 5 colônias foram identificadas pelo teste Ketolactose como *Agrobacterium tumefaciens* (Figura 16).

Tabela 5. Freqüência de manchas mutantes observadas nos descendentes MH (*mwh* ^{+/+} *flr*³) e BH (*mwh* ^{+/TM3}) de *Drosophila melanogaster*, do cruzamento ST, tratados com berinjelas geneticamente modificadas (Experimento I).

Tratamento	fruto	Concentração	Número de moscas		Número de manchas por asa				Total			
			BH	MH	Pequena simples (1-2cels.)		Grande simples (> 2cels.)			Gêmeas		
Cruzamento ST			BH	MH	BH	MH	BH	MH	BH	MH		
Controle positivo (CPH)		5mM	20	30	0,150 (06)	0,683 (41)	0,025 (01)	0,167 (10)	0,000 (00)	0,050 (03)	0,175 (07)	0,900 (54)
Berinjela HPT	1	50%	20	30	0,200 (08)	0,300 (18)	0,025 (01)	0,083 (05)	0,000 (00)	0,017 (01)	0,225 (09)	0,400 (24)
Berinjela SW5	3	50%	20	30	0,075 (03)	0,367 (22)	0,000 (00)	0,050 (03)	0,000 (00)	0,017 (01)	0,075 (03)	0,433 (26)

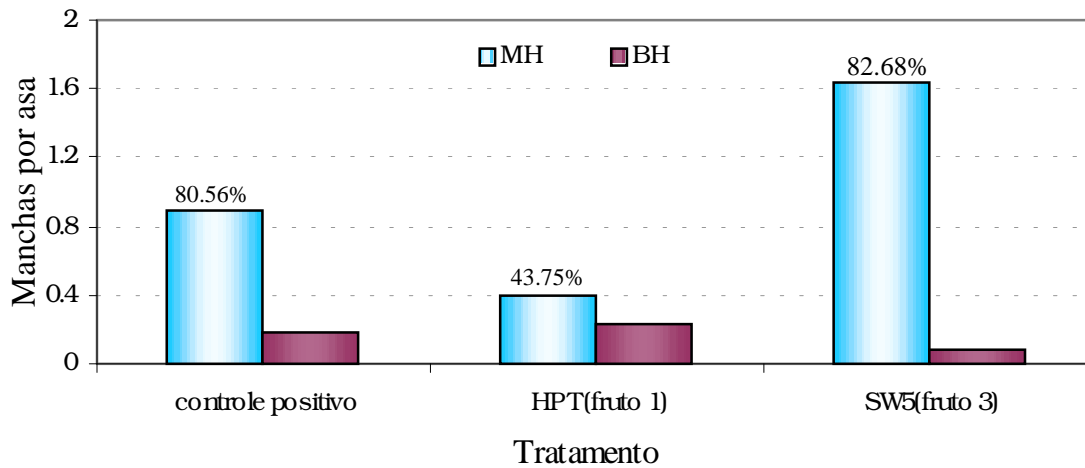


Figura 15. Distribuição de manchas *multiple wing hairs* (*mwh*) observadas em asas de *Drosophila melanogaster*, nos descendentes Marcadores-heterozigotos (MH) e Balanceadores-heterozigotos (BH) do cruzamento padrão = ST tratadas com berinjelas geneticamente modificadas (Experimento I), com a quantificação da porcentagem de recombinação encontrada nos compostos testados.



Figura 16. Colônias de *Agrobacterium tumefaciens* isoladas do fruto SW5-3. Controle positivo (LBA4404) à esquerda, e à direita colônias isoladas dos frutos transgênicos.

4. DISCUSSÃO

A transgênese é o foco de muitas discussões, devido à escassez de informações sobre os possíveis riscos à saúde humana e ao ambiente (CLARK & LEHMAN, 2001). Apesar das discussões e pouca informação a respeito da segurança, os campos de testes de transgênicos, o número de testes aprovados, a amplitude de espécies transgênicas testadas e o número de genes introduzidos têm aumentado (DUNWELL, 2000). O presente trabalho teve como objetivo a verificação dos possíveis efeitos genotóxicos das plantas transgênicas, utilizando o SMART.

No SMART pode-se fazer dois tipos de cruzamentos, o cruzamento-padrão (*Standard cross* - ST), fêmeas virgens são coletadas da linhagem *flr³/TM3 Bd^s* e cruzadas com machos *mwh*. Além desses, pode-se usar indivíduos que carregam os cromossomos 1 e 2 da linhagem Oregon R(R) resistente ao DDT. Esta é caracterizada por um alto nível de citocromo P-450 constitutivo e, pode melhorar o desempenho do teste, tornando-o mais sensível à ativação de promutágenos via citocromo P-450, cruzamento esse chamado alta bioativação (*High bioactivation cross* - HB) (FRÖLICH & WÜRGLER, 1989; GUZMÁN-RINCÓN & GRAF, 1995). A ativação de diferentes promutágenos é primariamente feita por enzimas do sistema citocromo P-450 (HÄLLSTRÖM et al., 1984), que faz parte de rotas de biotransformação de compostos tipo drogas, carcinógenos, solventes e pesticidas, assim como substâncias endógenas, estando a atividade e composição desse sistema sob controle genético. A variação determinada geneticamente no sistema citocromo P-450 tem significância para terapia com drogas, assim como para a sensibilidade para efeitos carcinógenos. As bases da variação e da regulação do sistema citocromo P-450 em nível genético são, contudo, difícil de ser reveladas (HÄLLSTRÖM & BLANCK, 1985).

A ciclofosfamida (CPH) é um agente alquilante e foi utilizado como controle positivo. Este composto foi claramente ativo no sistema testado, produzindo um aumento estatisticamente significativo na frequência total de manchas (Tabelas 1 - 5; Figuras 5 - 14). Os dados obtidos no presente trabalho corroboram com os resultados de ABRAHAM et al. (1986) e PREMKUMAR et al. (2001), nos quais a CPH foi utilizada como agente genotóxico no teste do micronúcleo em ratos para determinar a atividade antigenotóxica de vegetais e espirulina, respectivamente. O promutágeno CPH exibiu grande aumento da atividade genotóxica nas larvas do cruzamento HB em comparação com as larvas do cruzamento ST (Tabelas 1 - 4) como reportado previamente por ABRAHAM & GRAF (1996), e com Uretano por GRAF & VAN SCHAİK (1992), confirmando a alta sensibilidade do cruzamento HB a promutágenos que necessitam de ativação via citocromo P-450. Entretanto, a quantidade de citocromo P-450 encontrada nas larvas do cruzamento ST, apesar de menor, é suficiente para ativação de CPH (ABRAHAM & GRAF, 1996). Ciclofosfamida é um carcinógeno e teratógeno potente, utilizado no tratamento de vários tipos de câncer, tais como câncer de ovário, de seios e sistema linfático, nervos, retinoblastoma e mieloma múltiplo, pois atua principalmente em células neoplásicas. Deve ser utilizado com cautela, pois pode levar a perda de visão, danos ao fígado, anemia, dor de cabeça entre outros efeitos colaterais (National Library of Medicines, 2002).

Ao testar a atividade genotóxica, observou-se um aumento estatisticamente significativo nos tratamentos HPT-1 e SW5-3 (Tabela 1; Figura 5). Para o tratamento OZC-2 verificou-se uma frequência menor que a do controle, resultado observado no Experimento I. No Experimento II, observa-se um aumento estatisticamente significativo para manchas grandes simples nos tratamentos HPT-1 e OZC-2 no cruzamento HB (Tabela 2; Figura 8). Foram observados aumentos estatisticamente inconclusivos para manchas gêmeas em quase todos os tratamentos do Experimento II, exceto HPT-1 e OZC-4 do cruzamento ST e SW5-5 do cruzamento HB (Tabelas 2).

Para extratos aquecidos encontrou-se resultado positivo para manchas grandes simples e vários resultados inconclusivos (Tabela 4). Esses resultados inconclusivos, segundo FREI & WÜRGLER (1988) são devido à análise de um número pequeno de asas. Para obter desempenho melhor do teste, um número maior de asas deveria ser analisado, o que não foi feito devido o baixo número de moscas vivas emergidas das pupas de larvas tratadas.

Segundo GRAF et al. (1984), o SMART permite identificar nos compostos testados a

ausência de indução de certos tipos de manchas (simples pequena, simples grande ou gêmea), além de determinar a frequência de indução relativa, ou seja, dependendo do químico testado as frequências de manchas encontradas será diferente. Pode ocorrer de altas concentrações do composto testado induzir baixa taxa de mutação. Vários fatores podem contribuir para esta redução, entre esses pode-se citar, os efeitos repelentes das altas concentrações dos químicos que pode levar a uma baixa absorção do mutágeno nos experimentos de alimentação larval. Isto pode ser um problema principalmente em larvas de 72h, que podem sobreviver e empupar sem se alimentar. Ou ainda, exposições a níveis tóxicos, os adultos com absorção menor podem sobreviver mais e apresentar uma frequência de manchas menor do que a esperada.

Orizacistatina é um gene que confere resistência a insetos, pela expressão de um inibidor de proteinase. Inicialmente, justificou a resposta negativa encontrada no tratamento OZC-2 do Experimento I (Tabela 1; Figura 5) pela hipótese de um tratamento tóxico, com alta concentração da proteína reduzindo a absorção alimentar ou a sobrevivência das larvas. Dessa maneira, adicionou-se mais um tratamento com 25% da concentração de solutos inicial. Foi verificado no Experimento II, efeito não-significativo nesse tratamento (Tabela 2; Figuras 7 e 8), sugerindo que a proteína Orizacistatina não é tóxica ou não é assimilada pelas larvas de *D. melanogaster*.

No SMART, alguns compostos induzem uma maior proporção de manchas devido à recombinação, outros uma quantidade semelhante originadas por mutação e recombinação, e outros ainda, só por mutação. O registro da frequência e tamanho das diferentes manchas permitem a determinação quantitativa dos efeitos mutagênicos e recombinogênicos (GRAF et al., 1984). As manchas gêmeas são produzidas exclusivamente pela recombinação mitótica, ao passo que as manchas simples são formadas a partir de vários tipos de eventos mutacionais (GRAF, 1995).

A partir da análise e comparação dos dados de ambas as progênies (marcadora-heterozigota e balanceadora-heterozigota) dos tratamentos SW5 e HPT do Experimento I e controle positivo (CPH), verificou que o tipo de atividade genotóxica induzida por essas berinjelas transgênicas e CPH deu-se em uma frequência elevada a eventos de recombinação (Tabela 5; Figura 15). Existem vários mecanismos genéticos que levam a clones mutantes. Uma importante possibilidade é o evento de recombinação mitótica entre o alelo *flr*³ e o centrômero, no qual observa-se no fenótipo manchas gêmeas se durante a segregação a célula

filha receber um cromossomo recombinado e um não-recombinado. Já, se evento de recombinação ocorrer entre o alelo *flr*³ e *mwh* o fenótipo observado será de uma mancha simples. Se ambos os tipos de recombinação ocorrerem em uma mesma célula, será observada uma mancha *flr*³ (GRAF et al., 1984).

Manchas *mwh* induzidas predominantemente por eventos de recombinação apresentam frequência muito reduzida em larvas balanceadoras-heterozigotas, devido a presença de múltiplas inversões no cromossomo balanceador. Por outro lado, para mutágenos que agem diretamente por mecanismos independentes de recombinação são esperadas frequências iguais em ambas progênes (GRAF et al., 1984). Contudo, a análise dos dois genótipos permite uma determinação quantitativa da atividade recombinogênica das genotoxinas. Em indivíduos com cromossomos estruturalmente normais, ambos mutação e recombinação podem levar a formação de manchas simples e/ou gêmeas. Em contraste, em indivíduos balanceadores-heterozigotos, todos os eventos recombinacionais são eliminados devido a inversões múltiplas, e só eventos mutacionais podem dar origem a manchas simples (GRAF et al., 1992).

A recombinação observada pode ser devido a vários fatores, entre estes a toxidez do produto do transgene, a inserção do transgene por recombinação produzindo um composto tóxico e a inserção do T-DNA de *Agrobacterium* não eliminadas completamente das plantas transgênicas causando recombinação, ou o efeito genotóxico pode ser explicado pela combinação das três hipóteses.

É importante ressaltar que em dois dos frutos utilizados nos experimentos foram isoladas colônias de bactérias, sendo dessas identificadas pelo teste Ketolactose, colônias de *A. tumefaciens* (Figura 16). A bactéria do solo *A. tumefaciens* pode transferir parte do plasmídeo Ti, o T-DNA, para plantas. Os genes *vir* localizados no plasmídeo Ti efetuam esta transferência para a célula vegetal. O sistema de transferência codificado pelos genes *vir* assemelham-se aos usados pelas bactérias na conjugação. Contudo, as proteínas Vir entram nas células vegetais durante a transferência do T-DNA para protegê-lo e mediar o transporte até o núcleo (BUNDOCK & HOOYKAAS, 1996; ZUPAN & ZAMBRYSKI, 1995; SHENG & CITOVSKY, 1996). O T-DNA é integrado no genoma da planta por recombinação ilegítima (IR), um mecanismo que une duas moléculas de DNA que não são em toda a sua extensão homólogas, neste caso, o T-DNA e o DNA vegetal. Em organismos eucariontes evoluídos tais como vegetais, IR é o mecanismo predominante de integração do T-DNA. IR do T-DNA tem

sido descrito, mas pouco é conhecido sobre os fatores vegetais envolvidos (BUNDOCK & HOOYKAAS, 1996). BUNDOCK & HOOYKAAS (1996), demonstraram que embora o T-DNA se integre raramente por recombinação homóloga em plantas, esse se integra no genoma de *S. cerevisiae* apenas por recombinação homóloga, sugerindo que o mecanismo de integração do T-DNA é determinado pelo organismo hospedeiro e não pelo complexo T-DNA e proteínas Vir. Porém, quando falta homologia entre o genoma de levedura e o T-DNA a integração se dá por recombinação ilegítima, indicando a possibilidade da recombinação encontrada no SMART, ser devido a inserção do T-DNA da *A. tumefaciens* não eliminada da planta.

Essa eliminação total de *A. tumefaciens* dos tecidos é difícil, sendo os dados corroborados por LANDSMANN et al. (1999) que, a partir do exame por microscopia eletrônica de varredura de amostras foliares e caulinares de plantas transformadas, observaram bactérias em todas as cinco plantas testadas. Nas superfícies externas sempre foram encontradas colônias de bactérias, mas a distribuição não foi uniforme. A maioria dos brotos foi positiva em análise por PCR com *primers* para genes cromossomais de *A. tumefaciens*, porém negativa para os plasmídeos testados, pois esses foram instáveis.

A partir de seus experimentos SCHUBBERT et al. (1997) concluíram que o trato intestinal não é uma barreira para a absorção de macromoléculas ou microrganismos, pois a molécula de DNA do vírus M13mp18, administrado oralmente a ratos, foi encontrada ligada ao genoma de rato em células do fígado, baço e leucócitos identificada por PCR e hibridização *in situ* fluorescente, sendo que, para microrganismos patogênicos o trato intestinal é a principal rota de infecção. O DNA viral desprotegido, na ausência de cápsula, pode ultrapassar as barreiras intestinais, e com poucas horas integrar no genoma hospedeiro, talvez o transporte e a inserção do T-DNA bacteriano pode ser facilitada pelas proteínas Vir. Porém essa área do conhecimento requer a necessidade de mais estudos. De fato, pouco é conhecido a respeito da integração do T-DNA a planta e da possibilidade de ausência de eliminação total da *A. tumefaciens* e se esta pode causar efeitos genotóxicos, induzindo recombinação em células somáticas. Além disso, *A. tumefaciens* modificada residindo em plantas transgênicas no campo são capazes de transferir genes para outras bactérias no ambiente, sendo pouco conhecido os efeitos dessa transferência horizontal para os organismos e na evolução. Desses, o método de transformação mediado por *Agrobacterium* é um dos mais utilizados, a partir dos resultados obtidos nesse trabalho sugere-se a adoção dos outros métodos de transformação.

Nas condições em que os experimentos foram conduzidos, apesar das evidências de que extrato de berinjela transgênica induziu a recombinação somática em *Drosophila melanogaster*, conclui-se que a ausência de dados na literatura acerca da aplicação deste teste na caracterização de efeitos genotóxicos, advindos dos produtos dos transgenes, sugerem que outros estudos devam ser conduzidos, para determinar o(s) agente(s) indutor(es) de recombinação, inclusive aqueles advindos de bactérias residentes nos tecidos de frutos transformados e de possíveis situações de estresses de natureza biótica ou abiótica.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, S. K. & GRAF, U. 1996. Protection by coffee against somatic genotoxicity in *Drosophila*: role of bioactivation capacity. **Food and Chemical Toxicology**, **34** (1): 1-14.

ABRAHAM, S. K.; MAHAJAN, S. & KESAVAN, P. C. 1986. Inhibitory effects of dietary vegetables on the *in vivo* clastogenicity of cyclophosphamide. **Mutation Research**, **172**: 51-54.

BERNAERTS, M. J. 1963. A biochemical test for crown gall bacteria. **Nature**, **26** (197): 406-407.

BRASILEIRO, A. C. M. & CARNEIRO, V. T. C. 1998. **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: CENARGEM – SPI, 309p.

BRASILEIRO, A. C. M. & DUSI, D. M. A. 1999. Transformação genética de plantas. *In*: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. & BUSO, J. A. (eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**, v.2. Brasília: EMBRAPA/SPI. p. 697-736.

BUNDOCK, P. & HOOYKAAS, P. J. J. 1996. Integration of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA in the *Saccharomyces cerevisiae* genome by illegitimate recombination. **Proceedings of the National Academy of Science**, **93**: 15272-15275.

CARVALHO, H. C. 1987. **Fundamentos de Genética e Evolução**. Livraria Atheneu. Rio de Janeiro. RJ. 556p.

CLARK, E. A. & LEHMAN, H. 2001. Assessment of GM crops in commercial agriculture. **Journal of Agricultural and Environmental Ethics**, **14** (2): 3-28.

COLLONNIER, C.; FOCK, I.; KASYAP, V.; ROTINO, G. L.; DAUNAY, M. C.; LIAN, Y.; MARISKA, I. K.; RAJAM, M. V.; SERVAES, A.; DUCREUX, G. & SIHACHAKR, D. 2001. Applications of biotechnology in eggplant. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, **65**: 91-107.

DOMINGOS, J. L. 2000. Health risks of GM foods: many opinions but few data. **Science**, **288**: 1748-1749.

DUNWELL, J. M. 2000. Transgenic approaches to crop improvement. **Journal of Experimental Botany**, **51**: 487-496.

FÁRI, M.; NAGY, I.; CSÁNYI, M.; MITYKÓ, J. & ANDRÁSFALVY, A. 1995. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation and plant regeneration via organogenesis and somatic embryogenesis from cotyledon leaves in eggplant (*Solanum melongena* L. cv. 'Kecskeméti'). **Plant Cell Reports**, **15**: 82-86.

FREI, H. & WÜRGLER, F. E. 1988. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result. **Mutation Research**, **203**: 297-308.

FRÖLICH, A. & WÜRGLER, F. E. 1989. New tester strains with improved high bioactivation capacity for the *Drosophila* wing spot test. **Mutation Research**, **216**: 179-187.

FULTON, T.; CHUNWONGSE, J.; TANKSLEY, S. D. 1995. Microprep protocol for extraction of DNA transfer genes. **Science**, **273**: 1107-1109.

GRAF, U. 1995. Analysis of the relationship between age of larvae at mutagen treatment and frequency and size of spots in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Experientia**, **51**: 168-173.

GRAF, U.; HEO, O. S. & OLVERA RAMIREZ, O. 1992. The genotoxicity of chromium (VI) oxide in the wing spot test of *Drosophila melanogaster* is over 90% due to mitotic recombination. **Mutation Research**, **266**: 197-203.

GRAF, U. & VAN SCHAİK, N. 1992. Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research**, **271**: 59-67.

GRAF, U.; WÜRGLER, F. E.; KATZ, A. J.; FREI, H.; JUON, H.; HALL, C. B. & KALE, P. G. 1984. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Environmental Mutagenesis**, **6**: 153-188.

GURI, A. & SINK, K. C. 1988. *Agrobacterium* transformation of eggplant. **Journal of Plant Physiology**, **133**: 52-55.

GUZMÁN-RINCÓN, J. & GRAF, U. 1995. *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor. In: Butterworth, A. L. (eds.). **Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change**. Plenum Press: New York. p. 169-181.

HÄLLSTRÖM, I. & BLANCK, A. 1985. Genetic regulation of the cytochrome P-450 system in *Drosophila melanogaster*. I. Chromosomal determination of some cytochrome P-450 dependent reactions. **Chemical Biology Interactions**, **56**: 157-171.

HÄLLSTRÖM, I.; BLANCK, A. & ATUMA, S. 1984. Genetic variation in cytochrome P-450 and xenobiotic metabolism in *Drosophila melanogaster*. **Biochemical Pharmacology**, **33** (1): 13-20.

LANDSMANN, J.; GRASER, E. & MATZK, A. 1999. Elimination of agrobacteria from transgenic plants. **Methods for Risk Assessment of Transgenic Plants III. Ecological risks and prospects of transgenic plants**. Birkhäuser Verlag Basel/Switzerland. p. 63-67.

National Library of Medicines. [http://www.nlm.nih.gov/druginfo/drug_ci.html] Medline plus health information. 01/2002.

NEPOMUCENO, J. C. 1999. **Efeito protetor da *Moringa oleifera* contra mutações e recombinações somáticas induzidas pelo uretano e mitomicina-C em *Drosophila melanogaster*.** Brasília, DF: Faculdade de Ciências da Saúde, UnB, 1999. 120 p. Dissertação (Doutorado em Genética) – Universidade de Brasília - UnB.

OLVERA, O.; ZIMMERING, S.; ARCEO, C.; GUZMAN, J. & de la ROSA, M. E. 1994. Evidence for the protective effect of ascorbic acid (vitamin C) intreatment with γ -rays and chromium (VI) oxide (CrO_3) in somatic cells of *Drosophila*. **Mutation Research**, **346**: 19-21.

PICOLI, E. A. T. 2000. **Morfogênese *in vitro* e transformação genética de berinjela (*Solanum melongena* L. cv. Embú) mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.** Viçosa, MG: UFV, 2000. 141 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa.

PREMKUMAR, K.; PACHIAPPAN, A.; ABRAHAM, S. K. SANTHIYA, S. T.; GOPINATH, P. M. & RAMESH, A. 2001. Effect of *Spirulina fusiformis* on cyclophosphamide and mitomycin-C induced genotoxicity oxidative stress in mice. **Fitoterapia**, **72**: 906-911.

ROTINO, G. L.; PERRI, E.; ACCIARRI, N.; SUNSERI, F. & ARPAIA, S. 1997. Development of eggplant varietal resistance to insects and diseases via plant breeding. **Advanced Horticultural Science**, **11**: 193-201.

SCHUBBERT, R.; RENZ, D.; SCHMITZ, B. & DOERFLER, W. 1997. Foreign (M13) DNA ingested by mice reaches peripheral leukocytes, spleen, and liver via the intestinal wall mucosa and can be covalently linked to mouse DNA. **Proceedings of the National Academy of Science**, **94**: 961-966.

SHENG, J. & CITOVSKY, V. 1996. *Agrobacterium*-plant cell DNA transport: have virulence proteins, will travel. **The Plant Cell**, **8**: 1699-1710.

SILVA-FILHO, M. C. & FALCO, M. C. 2001. Plantas transgênicas no melhoramento. *In*: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S. & VALADARES-INGLIS, M. C. (eds.). **Recursos Genéticos e Melhoramento-plantas**. p. 1011-1056.

ZORDAM, M.; OSTI, M.; PESCE, M. & COSTA, R. 1994. Chloral hydrate is recombinogenic in the wing spot test in *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research**, **322**: 111-116.

ZUPAN, J. R. & ZAMBRYSKI, P. 1995. Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the plant cell. **Plant Physiology**, **107**: 1041-1047.