

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

Thiago Andrei de Sá

**Revisão bibliográfica sobre proteínas inseticidas e indução de brotos em capim-elefante
[*Cenchrus purpureus* syn *Pennisetum purpureum* (Schumach) Morrone], visando
resistência à cigarrinha-das-pastagens**

Juiz de Fora

2022

Thiago Andrei de Sá

**Revisão bibliográfica sobre proteínas inseticidas e indução de brotos em capim-elefante
[*Cenchrus purpureus* syn *Pennisetum purpureum* (Schumach) Morrone], visando
resistência à cigarrinha-das-pastagens**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso de Graduação em Ciências
Biológicas da Universidade Federal de Juiz de
Fora como requisito à obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Santos

Coorientador: Dr. Jorge Fernando Pereira

Juiz de Fora

2022

Imprimir na parte inferior, no verso da folha de rosto a ficha disponível em:


<http://www.ufjf.br/biblioteca/servicos/usando-a-ficha-catalografica/>

Thiago Andrei de Sá

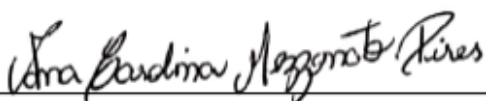
**Revisão bibliográfica sobre proteínas inseticidas e indução de brotos em capim-elefante
[*Cenchrus purpureus syn Pennisetum purpureum* (Schumach) Morrone], visando
resistência à cigarrinha-das-pastagens**

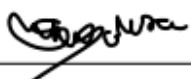
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovado em 11 de janeiro de 2023

BANCA EXAMINADORA
Documento assinado digitalmente
 **MARCELO DE OLIVEIRA SANTOS**
Data: 22/02/2023 10:25:07-0300
Verifique em <https://verificador.itl.br>

Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Santos - Orientador
Universidade Federal de Juiz de Fora


Profª Dra. Ana Carolina Mezzonato Pires
Universidade Federal de Juiz de Fora


Prof. Dr. Saulo Marçal de Sousa
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dedico este trabalho à minha avó Isabel Pereira (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer, primeiramente, aos meus pais por fornecer todo o apoio que necessitei no caminho trilhado até chegar à Universidade.

Também agradeço aos meus professores que me apoiaram durante minha trajetória na graduação, em especial à professora Andrea Luiz-Ponzo por ter sido a primeira professora a me receber em um laboratório; à professora Sthefane D'ávila por sempre apoiar minhas ideias e manter minha empolgação viva; à professora Ximena Ovando pelas conversas no Museu de Malacologia Professor Maury Pinto de Oliveira, à professora Camila Neves por aceitar um grupo de jovens estudantes que se voluntariaram para ajudá-la no acervo de minerais do CES (eu era um desses jovens); à professora Valquíria Medeiros por, no fim da minha graduação, ouvir minha história e meu sonho e me acolher em seu laboratório e, finalmente, ao meu orientador Marcelo de Oliveira por abrir as portas do laboratório para mim sem pensar duas vezes e por oferecer oportunidades de pesquisa ao longo da minha graduação e ao meu co-orientador Jorge Pereira por iniciar o desenvolvimento deste trabalho durante o período de pandemia.

Deixo aqui os meus agradecimentos à equipe do Laboratório de Genética e Biotecnologia, em especial ao Matheus Aragão por me introduzir na temática da genética (principalmente durante a pandemia) e à Letícia Queiroz, que esteve ao meu lado durante este último ano, não só nos momentos de comemoração, mas também nos momentos mais difíceis.

Um agradecimento especial aos professores que aceitaram compor a banca avaliadora: Ana Carolina Mezzonato Pires, Saulo Marçal de Sousa e Julliane Dutra Medeiros.

Ainda, agradeço à minha tia Luciane e à minha avó Isabel por serem aquelas que mais acreditaram em mim e à Tia Jane e à Tia Cidinha, que não são tias de sangue, mas o carinho recíproco transcende os laços familiares. Também agradeço às amigas que fiz durante a graduação e às amigas que fiz antes de ingressar na Universidade, mas que perdura até os dias atuais. Obrigado por me apoiarem nas minhas decisões.

Por fim, gostaria de agradecer ao CNPq e à CAPES pelas bolsas concedidas durante o desenvolvimento deste trabalho e de outras atividades durante minha graduação e à Universidade Federal de Juiz de Fora pelo programa de graduação em Ciências Biológicas e por todo o suporte que me foi oferecido.

"Não sou meu corpo, minha mente ou meu cérebro. Não sou meus pensamentos, sentimentos ou meu DNA. Sou um observador, uma testemunha da vida, e vivo no espaço entre as estrelas e o céu".

(Marina Diamandis)

RESUMO

O capim-elefante é uma gramínea de alto desempenho, muito utilizada no pastejo rotativo com enfoque na alimentação pecuária. Com diversas cultivares, uma que chama a atenção é a BRS Capiacu, que apresenta aumento na produção de matéria verde, resistência a estresse hídrico e à seca, mas não a insetos-praga. Dentre os insetos-praga que assolam as plantações de capim-elefante, pode-se destacar as cigarrinhas-das-pastagens, um agrupamento que reúne diversas espécies de hemípteros. Esses animais se alimentam da seiva da forrageira e liberam secreções salivares que impactam diretamente na produção de matéria verde, causando a queda na produção de clorofila. A partir disso, é importante que se desenvolva um capim-elefante capaz de resistir ao ataque desses insetos. Portanto, este trabalho teve como objetivo o levantamento de possíveis proteínas inseticidas para o capim e o desenvolvimento de um protocolo de indução de brotos de capim-elefante *in vitro* para transformação genética. Para tal, foram trazidas amostras de capim-elefante para a retirada dos meristemas laterais destes com intuito de induzi-los a gerar brotos. Antes da retirada dos meristemas, as estacas foram cortadas nos entrenós e lavadas com água corrente e detergente, depois banhadas em álcool 70% por dois minutos e então transferidas para solução de hipoclorito de sódio 2%. Por fim, foram lavadas em água com PPM 0,1% para a remoção dos meristemas. Assim, prepararam-se meios de cultura Murashige-Skoog (MS) com concentrações diferentes de BAP, TDZ e 2,4-D para analisar o desenvolvimento dos meristemas em diferentes concentrações. Os resultados indicaram que o melhor meio de cultura é aquele com 0,1 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 0,5 mg.L⁻¹ de BAP (MIB2). Para a curva de seleção, foram testadas diferentes concentrações de canamicina até 150 mg.L⁻¹, mas as análises estatísticas apontaram a concentração de 50 mg.L⁻¹ como a melhor. Dessa forma, para testar as chances de transformação, o trabalho prosseguiu com a co-cultura dos meristemas de capim com a *Agrobacterium*, a qual continha o gene GFP para fluorescência. As bactérias cresceram por dois dias em meio Luria Bertani (LB) e a amostra obteve 0,828 de absorvância. Os meristemas foram cortados ao meio e deixados em contato com a *Agrobacterium* por 40 minutos. Posteriormente, foram lavados em água com 0,1% de PPM e então inoculados em meio MIB2 sem canamicina. Três dias depois, esses meristemas foram transferidos para meio MIB2 com 50 mg.L⁻¹ de canamicina e foram trocados de placas sempre que havia indícios de contaminação. Uma semana depois, as amostras foram observadas ao microscópio invertido e foram constatados indícios de transformação em 14 dos 45 meristemas induzidos.

Palavras-chave: Capim-elefante. Cigarrinha-das-pastagens. Melhoramento genético. Transformação. *Agrobacterium*.

ABSTRACT

Elephant grass is a forage used to feed the cattle. It has multiple cultivars and one of them that calls attention is the BRS Capiacu, which has high livestock production, hydric stress, and drought resistance however it does not show resistance to pest insects. Among the insects that ravage elephant grass plantations, it is possible to highlight the spittlebug, an amount of insects from Hemiptera order. Those animals feed on sap and release salivary secretions which directly impact livestock production once it decreases the chlorophyll production. Hence it is important to develop an elephant grass that shows resistance to spittlebug. Therefore, this project aims to research insecticidal proteins and to develop an in vitro elephant grass shoot induction protocol to genetic transformation. Thereunto, the grass samples were brought to have their lateral meristems withdrawn and induced. The samples were cut and cleaned using water and detergent. Then they were bathed in alcohol 70% for two minutes and transferred to sodium hypochlorite 2% for 15 minutes. Finally they were washed in water with PPM 0,1% so the meristems could be withdrawn. Thus we developed Murashige-Skoog growth mediums with different concentrations of BAP, TDZ, and 2,4-D to analyse the meristem development. The results appointed the best growth medium as the one with 0,1 mg.L⁻¹ of TDZ and 0,5 mg.L⁻¹ of BAP (MIB2). For the selection curve we tested different concentrations of kanamycin until 150 mg.L although the best concentration was 50 mg.L⁻¹. Thereby in order to test the transformation we co-cultured the meristems with *Agrobacterium*, which had the GFP gene for fluorescence. The bacteria grew for two days in Luria Bertani growth medium and the sample had 0.828 of absorbance. The meristems were cut in the middle and rested in contact with the *Agrobacterium* for 40 minutes. Posteriorly, they were washed in water with 0.1% PPM and then inoculated in MIB2 with no Kanamycin. Three days later those meristems were transferred to MIB2 with 50 mg.L⁻¹ of Kanamycin and the Petri dishes were swapped whenever there were signs of contamination. One week later the samples were observed at the inverted microscope and the signs of transformation were seen in 14 out of 45 induced meristems.

Keywords: Elephant grass. Spittlebug. *Agrobacterium*. Genetic transformation. Genetic enhancement.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	– Tratamento do capim-elefante para esterilização.....	24
Figura 2	– Aparência dos brotos após 14 e 28 dias inoculados em meio MS contendo diferentes concentrações hormonais.....	27
Figura 3	– Aparência morfológica dos brotos após 14 dias de crescimento.....	28
Figura 4	– Indução de meristemas de capim-elefante em meio contendo canamicina, demonstrando a redução do desenvolvimento (A) e indícios de morte celular (B).....	31
Figura 5	– Focos de contaminação nas placas de co-cultura de capim-elefante.....	33
Figura 6	– Indícios de fluorescência em brotos de capim-elefante.....	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Relação entre cultivar e suas possíveis utilizações.....	16
Tabela 2	– Concentração de hormônios por meio de cultura.....	25
Tabela 3	– Porcentagem de brotos formados em 14 e 28 dias em relação a cada tratamento.....	26
Tabela 4	– Número de perfilhos e comprimento da raiz e do caule desses perfilhos em relação a cada tratamento.....	29
Tabela 5	– Concentração de canamicina em cada tratamento.....	30

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	A TEORIA	16
2.1	REVISÃO DA LITERATURA	16
2.2	BUSCA DAS POSSÍVEIS PROTEÍNAS	21
3	O PROTOCOLO	24
3.1	CULTIVO DO CAPIM-ELEFANTE EM LABORATÓRIO	24
3.2	PERFILHOS, RAIZ E COMPRIMENTO DO CAULE	28
3.3	CURVA DE SELEÇÃO	30
3.4	CO-CULTURA E TRANSFORMAÇÃO	32
3.5	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	34
4	CONCLUSÃO	36
	REFERÊNCIAS	37
	APÊNDICE A - Tabela compilada das proteínas registradas na revisão bibliográfica	43
	APÊNDICE B - Publicação da primeira parte do trabalho a respeito da revisão de proteínas de ação inseticida	50
	APÊNDICE C - Protocolo para indução de brotos de capim-elefante e co-cultura para transformação via <i>Agrobacterium</i>	51

1 INTRODUÇÃO

O capim-elefante [*Cenchrus purpureus* syn. *Pennisetum purpureum* (Schumach) Morrone] é uma gramínea originária do continente africano, mais especificamente do Zimbábue, de característica perene, classificada pelo hábito de crescimento cespitoso e pode atingir uma média de cinco metros de altura - o que confere o nome popular (Araújo, 1972). Ainda, há uma ampla diversidade de cultivares dessa e essa diversidade presente permite a exploração de variabilidade dentro de sua própria espécie (Carvalho, 1985). Portanto, a escolha da cultivar correta é de extrema importância, já que as utilizações e adaptações diferem entre si.

Atualmente, já foram desenvolvidas algumas cultivares para aprimorar o desempenho de tal no plantio, entretanto, como todas as plantações desenvolvidas *in vivo*, estas estão suscetíveis ao ataque de insetos-praga (Pereira, 1992). Como exemplo de um inseto-praga que causa impactos negativos no cultivo do capim-elefante, é possível citar a cigarrinha-das-pastagens (Hemiptera: Cercopidae) (Auad, 2007).

A cigarrinha-das-pastagens é um grupo polifilético representativo da ordem Hemiptera, classificada no filo Arthropoda, o qual se compõe por diversas espécies. Por conta da maneira como esses insetos se alimentam, são relatadas quedas na produção do capim-elefante em regiões detentoras de grande diversidade desse grupo animal (Auad et al., 2006). Dito isso, fica claro que o que é denominado como cigarrinha-das-pastagens, na verdade não faz referência ao nome popular de uma única espécie, mas sim de um aglomerado de espécies as quais são chamadas popularmente pelo mesmo nome e, dentre essas espécies, pode-se citar *Deois flavopicta* (Stal, 1854), *Mahanarva spectabilis* (Distant, 1909) e *Zulia entreriana* (Berg, 1879), todas com ocorrência no Brasil.

Dentre os impactos que tais cigarrinhas podem causar na plantação, os mais comuns e mais preocupantes são a restrição no crescimento da planta, a baixa na produção de matéria verde, a redução da capacidade de suporte da forrageira e a impalatabilidade que pode-se causar para com os animais que a consomem. Por conta disso, a produção de gado de corte e gado de leite são impactadas diretamente, o que causa também queda na produção em atividades dependentes da pecuária (Hewitt, 1985; Hewitt, 1988).

Portanto, é importante que se desenvolvam métodos para tornar as forrageiras, e dentre elas o capim-elefante, resistentes à ação de possíveis insetos-praga que podem impactar na produção agropecuária. Como sugestão de método, pode-se citar o desenvolvimento de capim-elefante transgênico para potencializar essa resistência.

Assim, faz-se necessário identificar possíveis proteínas de ação inseticida que possam ser utilizadas para o controle de hemípteros, em especial as cigarrinhas-das-pastagens, e desenvolver em laboratório a indução de brotos de capim-elefante para que a resistência destes seja testada.

Dessa forma, o objetivo deste trabalho é oferecer uma revisão de genes com ação inseticida para a utilização no controle de hemípteros e produzir um protocolo de desenvolvimento de brotos meristemáticos de capim-elefante *in vitro* atrelado à transformação genética via *Agrobacterium* para, posteriormente, promover a obtenção de um capim-elefante tolerante à ação das cigarrinhas-das-pastagens.

2 A TEORIA

2.1 REVISÃO DA LITERATURA

A espécie *Cenchrus purpureus* se configura como uma gramínea perene, com hábito de crescimento cespitoso, podendo chegar a uma média de cinco metros de altura. Apresenta folhas com cerca de 10 centímetros de largura e até um metro e meio de comprimento, com coloração entre o verde claro e o verde escuro (Araújo, 1972). Atualmente, essa gramínea é encontrada em todas as regiões brasileiras e é adaptada a altitudes que vão desde o nível do mar até acima de 2 mil metros. Apresentam uma faixa de temperatura ótima entre 18 e 30°C e, dependendo da cultivar, os indivíduos podem sobreviver a baixas temperaturas. Adaptam-se a muitos tipos de solo, com exceção daqueles pouco drenados, e a ambientes quentes e úmidos, por reproduzir principalmente na época de chuva (Carvalho et al., 1997). No entanto, é capaz de passar por períodos de seca com baixa produção. Essa gramínea não tolera baixo pH e alumínio no solo e propaga-se principalmente de modo vegetativo através dos colmos (Pereira, 2008).

O capim-elefante é comumente usado como forrageira de alto desempenho com intuito de potencializar a produção de pastejo rotativo focado na alimentação animal em sistemas de produção de leite, ou seja, aquela pastagem que é capaz de ser bem produzida em solos com baixa fertilidade, sem adubo e na seca (Machado et al., 2016). Além disso, essa gramínea apresenta qualidade nutricional satisfatória, facilidade de multiplicação e resistência à seca, a algumas pragas e a doenças (Faria, 1994).

Além de servir como alimentação animal, a biomassa do capim-elefante se mostra promissora para o desenvolvimento de biocombustível, do tipo etanol celulósico (etanol 2G), a partir dos açúcares produzidos pela planta (Flores, 2009). Essa gramínea também é usada na produção de lenha ecológica, um modo de substituir a madeira por gramíneas em fornos. Essa conclusão é fundada no fato do capim-elefante apresentar alta produtividade, uma vez que em um hectare obtém-se entre 150 e 200 toneladas de massa fresca, considerando dois cortes anuais (Santana et al., 2002).

Em relação às cultivares, a lista é extensa e elas se diferenciam por suas características baseadas na constituição genética e no valor agrônomo. As principais cultivares e suas principais formas de utilização são:

Tabela 1 – Relação entre cultivar de capim-elefante e suas possíveis utilizações

Cultivar	Formas de utilização
Napier	Formação de capineiras e pastagens.
Mineiro	Formação de capineiras e pastagens.
Cameroon	Pastejo rotativo, capineiras e pastagens.
Taiwan	Corte ou pastejo.
Pioneiro	Cobertura de falhas em pastagens, capineiras.
Mott	Formação de pastagens, forrageiras.
Paraíso	Formação de capineiras e pastagens por meio de sementes.
Roxo Botucatu	Formação de matéria seca.
BRS Capiacu	Formação de silagem, biomassa energética.

Fonte: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa).

Um dos cultivares de grande relevância é o BRS Capiacu, um clone do capim-elefante, com resultados que mostram o aumento da produtividade principalmente em suplementação volumosa na forma de silagem ou picado verde e na produção de biomassa energética. Com porte de cerca de 4,20 metros, possui alta produtividade e melhor valor nutritivo em relação a outras cultivares de capim-elefante. Durante a seca, é uma opção atraente por ter um custo menor em relação ao milho e à cana de açúcar para produção de matéria seca, possui boa tolerância a estresses hídricos, mas não às cigarrinhas-das-pastagens (Hemiptera: Cercopidae), principalmente quando mal manejada (Pereira, 2017).

Dessa forma, por estar exposta ao ambiente, é natural que essa forrageira sofra ataque de pragas agrícolas, que prejudicam as plantações em grande escala. Entre as pragas agrícolas, a mais comum é a cigarrinha-das-pastagens, quando se trata sobre capim-elefante. E apesar dos avanços com melhoramento genético para outras características do capim-elefante e até

algumas pragas, a resistência às cigarrinhas-das-pastagens ainda é um desafio (Aquad et al., 2007).

Em relação às cigarrinhas-das-pastagens, pode-se classificá-las como pertencentes à ordem Hemiptera, uma ordem composta por mais de 25 mil espécies distribuídas em quatro subordens, sendo três delas - Auchenorrhyncha, Heteroptera e Sternorrhyncha - com ocorrência no Brasil, as quais possuem várias representantes de espécies que causam prejuízo aos produtores brasileiros (Grazia et al., 2012). O nome “cigarrinha-das-pastagens” faz referência a um grupo animal polifilético com Bauplan semelhante composto por diferentes espécies que atacam plantas forrageiras, dentre as que causam mais impacto na agricultura brasileira são *Deois flavopicta* (Stal, 1854), *Mahanarva spectabilis* (Distant, 1909) e *Zulia entreriana* (Berg, 1879). Estes são classificados a partir das asas anteriores compostas por uma base coriácea, enquanto que a extensão da asa tem característica membranosa (Bernardo et al., 2003).

De acordo com Gallo et al. (2002), estes insetos põem ovos geralmente em abril, que podem ficar em quiescência durante o período de seca e frio. Por volta de outubro, as ninfas das cigarrinhas-das-pastagens começam a ser avistadas nas plantações, frequentemente instaladas às raízes e na base da planta, onde conseguem consumir sua seiva. Por conta disso, o aumento da temperatura do solo se mostra como um indicativo para a ocorrência das primeiras ninfas. Ainda, é comum encontrar uma espécie de espuma onde as ninfas estão aninhadas, o que confere a umidade necessária para a manutenção da vida desses insetos. As ninfas tornam-se adultos no mês de novembro e o pico de indivíduos ocorre entre fevereiro e março, podendo ocorrer três gerações até o mês de março.

Tanto as ninfas como os adultos deste inseto-praga se alimentam da seiva das plantas e, durante a alimentação, injetam uma toxina salivar ainda não descrita que impacta negativamente na síntese de clorofila. Essa interferência na síntese clorofílica resulta no amarelamento foliar, na restrição do crescimento da forrageira e na queda de produção de matéria verde (Hewitt, 1985; Hewitt, 1988). Além disso, o amarelecimento das folhas reduz a qualidade nutricional da forrageira e altera sua palatabilidade, o que impacta diretamente na capacidade de suporte desta (Souza et al., 2008).

É constatado que há baixa variabilidade genética quanto ao desempenho das forrageiras em relação ao ataque das cigarrinhas-das-pastagens (Alvarenga et al., 2017). Via de regra, grande parte das espécies de forrageiras utilizadas no Brasil apresenta fatores de antibiose (impacto no desempenho do inseto), antixenose (não preferência de uma planta por parte do inseto para alimentação, oviposição ou abrigo) e tolerância, podendo ser citado como exemplo

o capim-gordura (Kost; Heil, 2005; War et al., 2012). Entretanto, a maior parte dessas gramíneas enfrentam como obstáculo na resistência às cigarrinhas o fato desses insetos se encontrarem em quantidades relativamente maiores - uma média de 16 adultos por planta, em alguns casos - nas plantações (Cosenza et al. 1989).

Dito isso, fica esclarecido que a maior parte das forrageiras utilizadas na agropecuária brasileira possibilita algum nível de sobrevivência de ninfas das cigarrinhas-das-pastagens, o que é utilizado para definir a susceptibilidade das espécies (Aquad et al., 2006). Baseado em estudos com a espécie *Mahanarva spectabilis* - uma das representantes do grupo animal chamado popularmente de cigarrinha-das-pastagens e encontrada em grande abrangência no território brasileiro -, a resistência das diferentes espécies de forrageiras cultivadas no Brasil respeita, de uma forma geral, a seguinte ordem crescente de resistência: *Brachiaria ruziziensis* Germain & Evrard = *Uruchloa decumbens* Stapf < *P. purpureum* [capim-elefante (cv Roxo de Botucatu < cv Pioneiro)] = *Panicum maximum* Jacq < *Cynodon dactylon* (L.) Pers < *U. brizantha* (Hochst. ex A.Rich) R.D.Webster cv Marandu (Lapointe et al., 1992; Valério et al., 1997; Figueiredo et al., 2001; Cardona et al., 2004; Barros et al., 2021). Dessa maneira, por mais que essas forrageiras tenham desenvolvido algumas estratégias com intuito de se tornarem resistentes ao ataque de pragas agrícolas - por meio da produção de mais tricomas nas folhas, substâncias repelentes e até mesmo engrossamento do tecido epitelial, por exemplo - a obtenção de plantas geneticamente modificadas expressando proteínas de ação inseticida deve ser considerada, uma vez que nenhuma espécie de forrageira apresenta naturalmente alta resistência a várias espécies de cigarrinhas-das-pastagens (Kost; Heil, 2005; War et al., 2012).

O melhoramento genético de forrageiras envolve diversos procedimentos que possuem como objetivo alterar características específicas de interesse botânico e agrônômico. No caso do capim-elefante, como a maioria das forrageiras, seu melhoramento busca um melhor desempenho na produtividade animal ou de biomassa energética e, por isso, envolve complexas relações entre animal, ambiente e genótipo (Pereira et al., 2003).

Por mais que grande parte dos trabalhos voltados para o desenvolvimento de forrageiras geneticamente modificadas sejam focados no combate de espécies representantes do grupo de lepidópteros, há uma parcela voltada para a resistência de plantas para com espécies hemípteras. Algumas proteínas de ação inseticida que vêm sendo utilizadas para controles de insetos, sendo a proteína *cry* a mais conhecida. Esta proteína foi isolada da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt), uma bactéria Gram positiva que produz cristais proteicos com características inseticidas específicas, e é amplamente utilizada na agricultura para controle de

insetos mastigadores (lepidópteros e coleópteros) (Bravo et al., 2011). Esses cristais se solubilizam no intestino dos insetos e, a partir de atividades metabólicas intrínsecas, os cristais proteicos são degradados por enzimas e essas moléculas menores têm caráter tóxico para os insetos, mas não apresentam perigo para mamíferos (Campanini et al., 2012).

Essa técnica é muito utilizada em milhos, chamados milhos Bt, e outros cereais presentes na dieta humana, e pode ser estendida para o capim-elefante (Ikemura, 1985). Para se obter tal efeito, deve-se introduzir genes *cry* (proteínas inseticidas cristalinas) encontrados na bactéria Bt no embrião da planta estudada. Atualmente, já foram sequenciados diversos genes do tipo *Cry* e ainda descobriu-se que cada gene *cry* n (CRY1, CRY2, CRY3,...) funciona melhor quando se considera o inseto que assola a plantação, devido à via metabólica deste. Além disso, os genes *cry* já foram recodificados para que expressem a proteína *cry* (cristais proteicos) com vezes mais em relação à produção na bactéria de origem (Gustafsson et al., 2004). Dessa forma, o controle de pragas se torna muito mais eficiente sem se tornar um problema para o consumidor da monocotiledônea, como é o caso dos cereais que já se encontram em comercialização. Entretanto, há pouca informação sobre o uso de proteínas *cry* no controle eficaz de hemípteros.

Em monocotiledôneas, a transformação genética via *Agrobacterium* possui desafios como a dificuldade de identificar estirpes de bactérias que infectam estas plantas, devido à resistência da própria planta à infecção. Entretanto, esse cenário vem se moldando a uma nova realidade, considerando que as transformações de monocotiledôneas por *Agrobacterium* estão atingindo resultados cada vez mais satisfatórios (Ishida et al., 1996). A forma mais comum de transformação neste grupo é por biobalística, em que ocorre a transferência direta de genes em uma célula, porém esse processo pode inserir um alto número de cópias do gene de interesse e causar problemas de inserção e regulação destes (Handel et al. 1997). Além disso, este método possui um custo alto e requer equipamentos apropriados, o que torna a técnica via *Agrobacterium* e outras mais interessantes, mais acessíveis e mais utilizadas.

Em relação à resistência às cigarrinhas através de transgenia, é necessário antes identificar o genótipo alvo que será introduzido em determinada variação de capim-elefante já que algumas cultivares como Cameroon de Piracicaba, Pioneiro, Cuba 169, Santa Rita, Mineiro Ipeaco, Mercker Comum de Pinda e CNPGL 96-27-3 são mais resistentes a esta praga, seguindo o mecanismo de antibiose (Aquad et al., 2006).

A partir disso, é necessário estudos precisos sobre quais cultivares melhor se complementam ou, quando não é possível obter estes dados, o intercruzamento entre os clones selecionados. Nesse caso, o método aplicado poderia ser a hibridação intraespecífica,

que constitui uma das melhores estratégias para se obterem cultivares superiores, segundo Hanna (1999).

Outra maneira de realizar a transgenia do capim-elefante seria a transformação via *Agrobacterium*. Para isso, o gene de interesse deve ser estudado, escolhido e construído para integração futura no espécime em questão. Nessa estratégia, um estudo molecular sobre o genótipo da planta fonte do explante seria necessário, podendo se tornar mais trabalhoso que a estratégia anterior em questão, mas mais específico quando realizado com eficiência (Andrade, 2003).

Outra linha de pesquisa feita por Mi et al. (2016) utilizou a aglutinina de *Galanthus nivalis* L. associada aos promotores CaMV 35S - que promove a expressão de moléculas de caráter inseticida de genes externos por todos os tecidos vegetais - e ST-LS1 - expressados em tecidos fotossintetizantes apenas -, sendo este com três linhagens transgênicas. O trabalho constatou que o índice de mortalidade de hemípteros foi entre 20 e 53,3% (maior valor com o promotor ST-LS1) logo nos cinco primeiros dias após a inoculação das linhagens transgênicas. Ainda, a população de hemípteros crescia mais devagar nas plantas com gene GNA se comparada às plantas controle. Ao fim do estudo, o número de indivíduos por planta foi muito reduzido, chegando a 17 indivíduos em plantas tratadas pela linhagem de promotores ST-LS1. Essa técnica é mais utilizada em pesquisas envolvendo arroz, tabaco, algodão e batata, mas não em monocotiledôneas, como é o caso do capim-elefante (Rao et al., 1998; Hilder et al., 1995; Foissac et al., 2000).

Para melhorar a base de recursos genéticos, são necessários sequenciamentos e notações genômicas que permitam entender e identificar características responsáveis por determinadas características. Em 2020, com os objetivos citados foram realizados trabalhos sobre o aumento do potencial alimentar do capim Napier, que se deu com um estudo de quarenta e cinco genótipos da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) de cultivares forrageiras. Os resultados revelaram diversas características, entre as mais relevantes está a identificação de genótipos de alto desempenho que são candidatos para futuros estudos de melhoramento da forragem com base na biomassa cumulativa e produção de energia (Habte et al, 2020).

2.2 BUSCA DAS POSSÍVEIS PROTEÍNAS

Para a pesquisa dos possíveis genes a serem utilizados nesta pesquisa, foram buscadas as palavras-chave “hemiptera” e “insecticidal protein” no repositório de artigos científicos

PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>), avaliando todos os materiais lá publicados entre os anos de 2001 e 2020.

A pesquisa resultou em 663 artigos, sendo que 53 destes descreviam proteínas com ação inseticida contra insetos da ordem Hemiptera. Dentro desses 53 artigos, foram listados 70 linhas de pesquisa diferentes, uma vez que alguns artigos apresentavam mais de uma proteína a critério de comparação, ou então utilizavam a mesma proteína de maneiras diferentes, o que resultava em resultados diferentes. A critério de organização, as proteínas descritas foram tabeladas e divididas em cinco grandes grupos: originadas de animais, de bactérias, de fungos, de plantas e produzidas em laboratório (Apêndice A). A partir disso, foi possível traçar comparações entre uma proteína e outra, analisando fatores intrínsecos destas, tais como o modo de ação da proteína e a taxa de mortalidade em uma população de hemípteros.

O grupo das plantas se mostrou como aquele contendo a maior quantidade de proteínas estudadas, com 32 artigos publicados e 42 linhas de pesquisa. Dentre esses estudos, oito constavam proteínas do alho comum (*Allium sativum* L.) e oito da leguminosa *Canavalia ensiformis* (L.) DC, os quais se consolidaram como as espécies mais utilizadas durante as pesquisas.

O grupo de proteínas extraídas de fungos contou com dez artigos científicos e 14 linhas de pesquisa, sendo que cinco destas utilizavam a espécie *Xerocomellus chrysenteron* (Bulliard) Quelét como fonte das proteínas estudadas.

Em relação ao grupo de animais, foram listados quatro artigos publicados com sete linhas de pesquisa, sendo destas, duas abordando proteínas da espécie *Segestria florentina* Rossi, uma espécie de aranha, e dois de *Manica rubica* Latreille, uma espécie de formiga.

Para o grupo de bactérias, foram constatados seis artigos abordando seis linhas de pesquisa, sendo todas elas com espécies de bactérias diferentes. Dentre essas espécies estão *Bacillus thuringiensis* Berliner (em associação com proteína de *Allium sativum* L.), *Photorhabdus luminescens*, *Pseudomonas entomophila*, *Pseudomonas fluorescens*, *Xenorhabdus bovienii* e *Xenorhabdus nematophilus*.

Já o grupo representativo das proteínas desenvolvidas em laboratório contou com apenas um estudo desenvolvido, o qual originou a v-ATPaseA, uma proteína similar à v-ATPase encontrada em organismos eucariontes.

No tocante ao ano de publicação dos artigos, 18 foram publicados nos últimos cinco anos, variando de uma a sete publicações por ano. Nestes artigos, as proteínas mais utilizadas foram lectinas e aglutininas, com um enfoque especial na aglutinina de *Galanthus nivalis* e de

Allium sativum, somando um total de 14 estudos (aqui podendo ser contado mais de uma vez por artigo, dependendo do modo como a proteína foi utilizada).

Um ponto decisivo para a seleção de proteínas foi a taxa de mortalidade desta perante uma população de hemípteros. Dentre os 70 estudos desenvolvidos nos 53 artigos, dez não constavam qualquer índice de mortalidade, nove possuíam taxa de mortalidade menor ou igual a 40%, dez com índice entre 40% e 70% e 41 estudos com taxa maior que 70%, sendo 17 destes com índice de mortalidade igual a 100%. Após essa análise, procuraram-se pelos estudos que apresentavam proteínas que causavam impacto direto nos hemípteros e não somente influenciando na fertilidade e na reprodução desses animais. Assim, foi possível reduzir a quantidade de opções a sete, as quais causavam toxicidade para os insetos.

Listadas as sete possíveis proteínas para o presente estudo, foram analisadas o tempo demandado para que se atingisse 100% de mortalidade na população estudada. Assim, três possíveis proteínas foram selecionadas, sendo estas a quitinase de *Pseudomonas fluorescens* (72 horas) (Suganthi et al., 2017), a avidina recombinante de *Gallus gallus* (quatro dias) (Hinchliffe et al., 2010) e a proteína SF11 de *Segestria florentina* associada a GNA (sete dias) (Down et al., 2005).

3 O PROTOCOLO

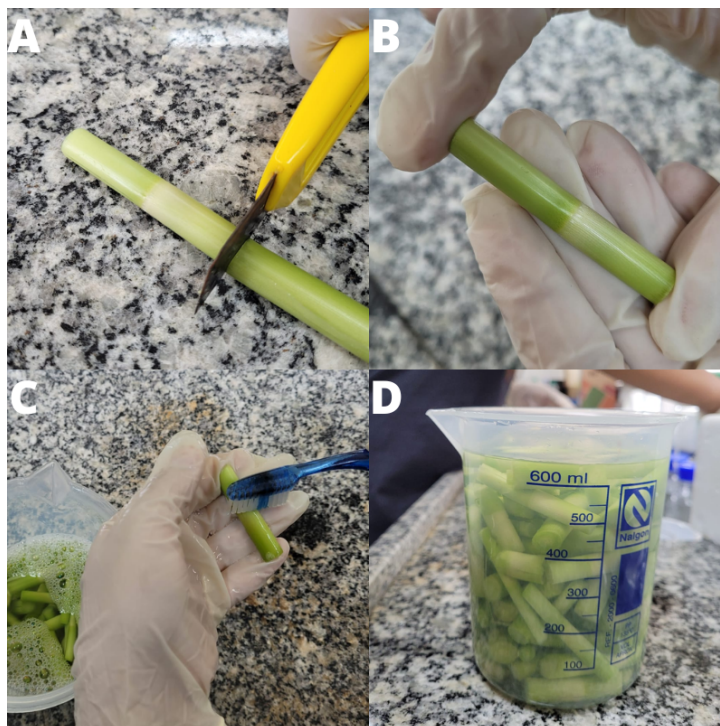
3.1 CULTIVO DO CAPIM-ELEFANTE EM LABORATÓRIO

As amostras de capim-elefante correspondentes à cultivar BRS Capiáçu foram trazidas adultas semanalmente ao longo de dois meses, retiradas da fazenda da Embrapa Gado de Leite, em Coronel Pacheco, Minas Gerais, com média de 150 amostras por semana.

Cada amostra foi lavada com água corrente e detergente para a retirada de detritos, depois cortada na região dos entrenós com um estilete para a extração do meristema lateral. As amostras que continham somente o meristema apical foram descartadas, uma vez que o presente trabalho pretende induzir brotos a partir de meristemas laterais.

As secções foram colocadas em um béquer com água e detergente e escovadas com uma escova de dentes (Figura 1). Logo após, as porções foram deixadas de molho em álcool 70% (v/v) por 2 minutos seguida de submersão em solução de hipoclorito de sódio 2% (NaOCl) (v/v) e então foram transferidas para o fluxo e lavadas em água destilada três vezes por 30 segundos cada lavagem.

Figura 1 – Tratamento do capim-elefante para esterilização



Fonte: Elaborada pelo autor (2022)

A: corte no entre-nó de uma estaca de capim-elefante. B: fragmento de uma estaca de capim-elefante que será utilizado para remoção do meristema lateral. C: escovação do fragmento. D: submersão dos fragmentos em álcool 70%.

Em uma placa de petri, em cada secção das amostras de capim-elefante foi feita uma incisão com um bisturi em ambos os lados mais estreitos, os lados que não correspondem ao sulco e à presença do meristema. Com o auxílio de uma pinça esterilizada em fogo, a epiderme da secção foi removida e, posteriormente, o meristema, quando este estava desenvolvido e com um tamanho maior que quatro milímetros. Os meristemas foram removidos com o bisturi, destacando-o da membrana do caule e retirando-o a partir de uma incisão no ponto em que estes se fixavam no corpo vegetal. Por fim, os meristemas foram posicionados em outra placa de petri contendo meio de cultura. Cada placa de petri recebeu quatro meristemas.

Foram utilizados cinco meios com a base de 4,4 g.L⁻¹ (p/v) de meio Murashige–Skoog (MS), 30 g.L⁻¹ (p/v) de sacarose, 6 g.L⁻¹ (p/v) de ágar, 250 g.L⁻¹ (v/v) de Timentin e 0,1% de Plant Preservative Mixture (PPM) (v/v). Em quatro meios foram inseridos diferentes concentrações de ácido 2-4-diclorofenoxiacético (2.4-D), de benzilaminopurina (BAP) e thidiazuron (TDZ) - hormônios escolhidos de acordo com a disponibilidade no laboratório -, e em um não houve adição de hormônios, este sendo o meio controle [MIB0 (D0B0T0)]. O meio MIB1 apresentou as concentrações hormonais iguais a 0,5 mg.L⁻¹ de 2.4-D, 2 mg.L⁻¹ de BAP e 0 mg.L⁻¹ de TDZ (0.5D2B0T). O meio MIB2 foi igual a de 0,1 mg.L⁻¹ de 2.4-D, 2 mg.L⁻¹ de BAP e 0 mg.L⁻¹ de TDZ (0.1D2B0T). Já o meio MIB3 teve adição de 0,5 mg.L⁻¹ de 2.4-D, 0 mg.L⁻¹ de BAP e 2 mg.L⁻¹ de TDZ (0.5D0B2T) e o meio MIB4 de 0,1 mg.L⁻¹ de 2.4-D, 0 mg.L⁻¹ de BAP e 2 mg.L⁻¹ de TDZ (0.1D0B2T).

Todos os meios foram ajustados ao pH de 5,8, levados ao microondas por 2,5 minutos e esterilizados a 121°C por 20 minutos no autoclave.

Tabela 2 – Concentração de hormônios para meio de cultura

Meio de cultura	2.4-D (mg.L ⁻¹)	BAP (mg.L ⁻¹)	TDZ (mg.L ⁻¹)
MIB0 (D0B0T0)	0	0	0
MIB1 (0.5D2B0T)	0,5	2	0
MIB2 (0.1D2B0T)	0,1	2	0
MIB3 (0.5D0B2T)	0,5	0	2
MIB4 (0.1D0B2T)	0,1	0	2

Fonte: elaborada pelo autor (2022).

Foram feitas dez placas de petri para cada meio de cultura, totalizando 50 placas de petri. Como cada uma destas recebe quatro meristemas, foram totalizados 120 meristemas inoculados. As placas foram dispostas em uma estante na sala de crescimento vegetal do Laboratório de Engenharia Genética do ICB, a qual constava com um sistema de iluminação 16/8 (16 horas de claridade para 8 horas com as luzes apagadas).

Os meristemas laterais inseridos em meio de cultura nas placas de petri foram observados ao longo de 28 dias, com medições no dia 14 e no dia 28.

No dia 14, os meristemas foram trocados de placa para manter o crescimento e evitar contaminação, mas se mantendo em meios de cultura com as respectivas concentrações hormonais, e nenhum dos tratamentos demonstrou indução de brotos ($i = 0 \pm 0$).

No dia 28, os meristemas do tratamento MIB0 continuaram sem apresentar indução de brotos ($i = 0\% \pm 0$), enquanto que os meristemas tratados com MIB1 resultaram em formação de brotos em 32,14% dos meristemas ($i = 23,14\% \pm 0,47$) e aqueles do tratamento MIB2 com 93,75% de indução de brotos ($i = 93,75\% \pm 0,24$). Os meristemas do tratamento MIB3 apresentaram indução de brotos em 32,14% indivíduos ($i = 32,14\% \pm 0,47$) e aqueles tratados com MIB4 resultaram e 58,62% de indução de brotos ($i = 58,62\% \pm 0,5$).

Tabela 3 – Porcentagem de brotos formados em 14 e 28 dias em relação a cada tratamento

Tratamento	Porcentagem de brotos formados após 14 dias	Porcentagem de brotos formados após 28 dias
MIB0 (D0B0T0)	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00a
MIB1 (D0.5B2T0)	0,00 \pm 0,00	32,14 \pm 0,47ab
MIB2 (D0.1B2T0)	0,00 \pm 0,00	93,75 \pm 0,24
MIB3 (D0.5B0T2)	0,00 \pm 0,00	32,14 \pm 0,47abc
MIB4 (D0.1B0T2)	0,00 \pm 0,00	58,62 \pm 0,50bc

Fonte: elaborada pelo autor (2022).

Os resultados analisados no 14º dia não apresentaram valor significativo pelo teste de Tukey. Entretanto, analisando os meristemas no 28º dia, observou-se que, em comparação ao MIB0 (controle), os meios MIB2 e MIB4 tiveram valor significativo, enquanto que os meios MIB1 e MIB3 não apresentaram $p < 0,05$. Além disso, o meio MIB4 não apresentou valor significativo quando comparado com os meios MIB1 e MIB3, somente com o meio MIB2.

Por fim, o meio MIB2 obteve valor significativo quando comparado com todos os outros meios de cultura (Figura 2).

Figura 2 – Aparência dos brotos após 14 e 28 dias inoculados em meio MS contendo diferentes concentrações hormonais



Fonte: Paiva, V.

Para as fotos foram escolhidos os brotos mais representativos de cada grupo, ou seja, aqueles que representavam como a maior parte dos indivíduos se desenvolveu.

Analisando esses resultados, fica claro que o melhor tratamento a se escolher seria o MIB2 (0.1D2B0T), uma vez que os dados apontam a melhor indução de brotos meristemáticos de capim-elefantes, com um índice de indução maior que 90%, sendo o único tratamento a apresentar um índice tão elevado, considerando que o índice de indução de brotos dos outros tratamentos foram iguais a 32,14% (MIB1 e MIB3) e 58,62% (MIB4), o que demonstra uma ampla diferença.

Passados 28 dias, já com o desenvolvimento dos meristemas em brotos, estes foram transferidos para vidros de *baby food* para que pudessem se desenvolver melhor. Cada amostra foi transferida para um recipiente contendo o meio de cultura e as proporções hormonais previamente estabelecidas referentes ao meio e às proporções hormonais contidos nas placas de petri em que estava inserida. Cada vidro de *baby food* continha apenas uma única amostra de *C. purpureum*.

Após 14 dias, as amostras foram retiradas dos vidros de *baby food* e analisadas.

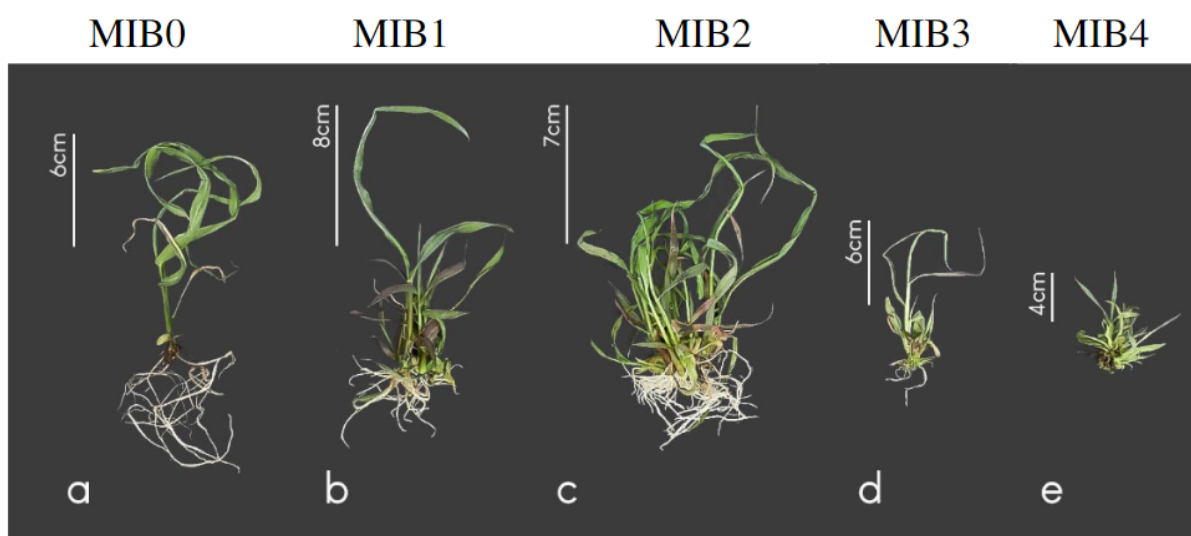
3.2 PERFILHOS, RAIZ E COMPRIMENTO DO CAULE

Passados 14 dias da transferência dos brotos das placas de petri para vidros de *baby food*, as amostras foram retiradas dos recipientes e tiveram seus dados recolhidos (Figura 3). Tais dados são referentes à quantidade de perfilhos desenvolvidos, o comprimento de cada perfilho até o brotamento da folha mais distal e o comprimento da raiz da amostra geral.

Para os perfilhos, tentou-se ao máximo individualizá-los, entretanto, quando não era possível, considerava-se o conjunto como um único perfilho, medindo do início do caule até a porção distal do maior caule com o auxílio de uma régua. Normalmente, isso acontecia com perfilhos muito pequenos tanto em comprimento quanto em largura.

Passados 14 dias da transferência dos brotos das placas de petri para vidros de *baby food*, estes foram analisados a partir da contagem de perfilhos, do comprimento da raiz da amostra e do comprimento de cada perfilho, posteriormente reunidos em uma média.

Figura 3 – Aparência morfológica dos brotos após 14 dias de crescimento



Fonte: elaborada pelo autor (2022).

Após 14 dias, os dados dos perfilhos foram coletados. A imagem A é referente ao tratamento MIB0, a imagem B, ao tratamento MIB1; a imagem C, ao tratamento MIB2; a imagem D, ao tratamento MIB3 e a imagem E, ao tratamento MIB4.

Para o tratamento MIB0 (D0B0T0), foi obtida a média de um perfilho por amostra ($i = 1 \pm 0,47$). Já o tratamento MIB1 (0.5D2B0T) apresentou a média de seis perfilhos ($i = 6 \pm 2,4$) e o tratamento MIB2 (0.1D2B0T) resultou em uma média de 5,8 perfilhos por amostra ($i = 5,8 \pm 3,05$). Enquanto isso, o tratamento MIB3 (0.5D0B2T) se mostrou com 6,6 perfilhos

em média ($i = 6,6 \pm 0,94$) e o tratamento MIB4 (0.1D0B2T) resultou em 5,7 perfilhos por amostra ($i = 5,7 \pm 3,86$).

Em relação ao comprimento da raiz, estas foram medidas antes de separar os perfilhos unitariamente, uma vez que nem todo perfilho se separava com raiz inclusa. Assim, levou-se em comprimento da maior ramificação radicular. Dessa forma, os resultados obtidos são descritos como igual a 12,84 centímetros ($i = 12,84 \pm 6,56$) para o tratamento MIB0 (D0B0T0); 9,3 centímetros ($i = 9,3 \pm 2,20$) para o tratamento MIB1 (0.5D2B0T); 6,77 centímetros ($i = 6,77 \pm 3,51$) para o tratamento MIB2 (0.1D2B0T); 3,06 centímetros ($i = 3,06 \pm 2,95$) para o tratamento MIB3 (0.5D0B2T) e 0,58 centímetros ($i = 0,58 \pm 1$) para o tratamento MIB4 (0.1D0B2T).

Para o comprimento do caule dos perfilhos, mediu-se desde o ponto em que o caule e a raiz se diferenciam até o ponto do nó responsável pelo surgimento da folha mais distal. Com isso, os resultados obtidos se mostram como 3,8 centímetros ($i = 3,8 \pm 1,34$) para o tratamento MIB0 (D0B0T0); 2,88 centímetros ($i = 2,88 \pm 0,33$) para o tratamento MIB1 (0.5D2B0T); 6,77 centímetros ($i = 6,77 \pm 0,87$) para o tratamento MIB2 (0.1D2B0T); 1,55 centímetros ($i = 1,55 \pm 0,29$) para o tratamento MIB3 (0.5D0B2T) e 1,17 centímetros ($i = 1,17 \pm 0,46$) para o tratamento MIB4 (0.1D0B2T).

Tabela 4 – Número de perfilhos e comprimento da raiz e do caule desses perfilhos em relação a cada tratamento

Tratamento	Número de perfilhos	Comprimento da raiz (cm)	Comprimento do caule (cm)
MIB0 (D0B0T0)	$1 \pm 0,47a$	$12,84 \pm 6,56a$	$3,8 \pm 1,34a$
MIB1 (0.5D2B0T)	$6 \pm 2,40ab$	$9,3 \pm 2,20ab$	$2,88 \pm 0,33ab$
MIB2 (0.1D2B0T)	$5,8 \pm 3,05bc$	$6,77 \pm 3,51bc$	$6,77 \pm 0,87bc$
MIB3 (0.5D0B2T)	$6,6 \pm 0,94bcd$	$3,06 \pm 2,95bc$	$1,55 \pm 0,29bc$
MIB4 (0.1D0B2T)	$5,7 \pm 3,86bd$	$0,58 \pm 1$	$1,17 \pm 0,46$

Fonte: elaborada pelo autor (2022).

Dessa forma, analisando os resultados obtidos com essa análise atrelados ao resultado da indução de brotos previamente apresentado, é possível sugerir que o meio que melhor induz os brotos e os mantém com padrões de desenvolvimento desejáveis é o MIB2, já que, além da porcentagem de indução de brotos maior que 90%, esse meio promove a melhor

razão de comprimento entre raiz e caule, além de uma média satisfatória de perfilhos por vidro de *baby food*.

Portanto, para o desenvolvimento da curva de seleção, o meio escolhido foi o MIB2.

3.3 CURVA DE SELEÇÃO

Para a curva de seleção, precisou-se de mais amostras de meristema de capim-elefante. Portanto, seguiu-se o método descrito no tópico 3.1 para a extração do capim.

Em relação ao meio de cultura, foram desenvolvidos seis, produzidos a partir do meio MIB0 controle descrito no tópico 3.1 e com adição de canamicina em concentrações diferentes. Estes foram nomeados como A, B, C, D, E e F. O meio A é referente ao controle, portanto não apresentou adição de canamicina. O meio B apresenta 25 mg.L⁻¹ de canamicina, o meio C possui 50 mg.L⁻¹ de canamicina, o meio D apresenta 75 mg.L⁻¹ de canamicina, o meio E possui 100 mg.L⁻¹ de canamicina e, por fim, o meio F contém 150 mg.L⁻¹ de canamicina.

Tabela 5 – Concentração de canamicina em cada meio de cultura

Meio de cultura	Canamicina
A	0 mg.L ⁻¹
B	25 mg.L ⁻¹
C	50 mg.L ⁻¹
D	75 mg.L ⁻¹
E	100 mg.L ⁻¹
F	150 mg.L ⁻¹

Fonte: elaborada pelo autor (2022).

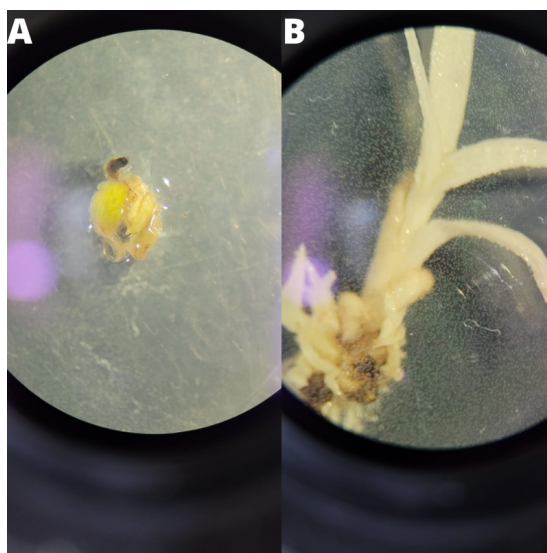
Cada meio foi distribuído em cinco placas de petri, totalizando 30 placas. Em cada placa, foram inseridos cinco meristemas. Após 14 dias, os explantes foram transferidos para novas placas possuindo o mesmo meio e concentrações de canamicina referentes à placa anterior e no dia 28 a capacidade de diferenciação de brotos foi registrada.

Os resultados obtidos apontaram que os meristemas inseridos na concentração de 0 mg.L⁻¹ de canamicina tiveram 100% de viabilidade, o que era esperado. Para o meio B, 80%

dos meristemas se desenvolveram. No meio C, 70% dos brotos foram viáveis. Para o meio D, o resultado de viabilidade foi de 44%. Para o meio E, obteve-se 41% de viabilidade e para o meio F, 21%.

Os meristemas inseridos em meios com concentração acima de 25 mg.L^{-1} de canamicina demonstraram redução no desenvolvimento do broto, oxidação e branqueamento das folhas, indicando morte celular (Figura 4). Os explantes de concentrações acima de 100 mg.L^{-1} demonstraram esses indícios em maior proporção, enquanto que aqueles inseridos em meio com 25 mg.L^{-1} expressavam poucas alterações e os meristemas inseridos em 50 mg.L^{-1} de canamicina demonstraram impacto principalmente no crescimento do broto, mas não indicavam altas taxas de morte celular.

Figura 4 – Indução de meristemas de capim-elefante em meio contendo canamicina, demonstrando a redução do desenvolvimento (A) e indícios de morte celular (B)



Fonte: elaborada pelo autor (2022)

Assim, analisando a taxa de morte celular nos explantes de cada concentração de canamicina, o meio C (50 mg.L^{-1}) foi o escolhido, pois permitia que os meristemas se desenvolvessem, todavia exercia influência direta no crescimento destes, fazendo-os crescerem de forma contida.

3.4 CO-CULTURA E TRANSFORMAÇÃO

Para o desenvolvimento da co-cultura, primeiramente foi preparado o meio Luria Bertani (LB), adicionando 10 g.L^{-1} gramas de triptona, 5 g.L^{-1} gramas de extrato de levedura,

10 g.L⁻¹ gramas de NaCl e 250 mililitros de água destilada. O pH da solução foi corrigido para 7,4. Após isso, foram adicionados 50 mg.L⁻¹ de rifampicina, 30 mg.L⁻¹ de gentamicina e 25 mg.L⁻¹ de estreptomicina.

As amostras de *Agrobacterium tumefaciens* foram descongeladas e inoculadas na proporção de 50 µl para cada 3 ml de meio LB líquido. A cepa de *A. tumefaciens* selecionada foi a GV3101 contendo o gene da proteína GFP, responsável pela fluorescência quando esta é associada ao material genético do organismo estudado, e foram transferidas para um meio LB.

Foram feitos dois tubos de Falcon (LB1 e LB2) nas mesmas proporções para averiguar o crescimento bacteriano após os dois dias de incubação.

A linhagem de *A. tumefaciens* foi cultivada antecipadamente em meio LB líquido contendo antibióticos para seleção em agitador por 48 horas na temperatura de 25°C.

Passado o tempo de seleção, a absorbância foi aferida no espectrofotômetro, utilizando a cubeta. O meio LB1 obteve absorbância de 0,828 e o meio LB2 obteve 0,768. Dessa forma, o meio LB1 foi o escolhido para a transferência de *A. tumefaciens* para a co-cultura. Para tal, centrifugou-se a cultura por 30 minutos, ressuspendeu-a em meio MIB0 líquido (item 3.1) com 80 mg.L⁻¹ de acetoseringona.

Em relação aos meristemas, estes foram deixados em água com PPM 0,1% por cinco minutos e depois foram lavados seis vezes em água. Então, cada meristema foi seccionado ao meio de ponta a ponta e, em seguida, foram introduzidos no meio MIB0 líquido e deixados em contato com as agrobactérias por 40 minutos para que estas pudessem penetrar o tecido vegetal e promover a transformação.

Após esse tempo, os meristemas laterais foram retirados com um auxílio de uma pinça estéril e transferidos para uma placa de petri forrada com papel filtro. Assim, foi possível remover o excesso de cultura com papel filtro. Por fim, cada meristema foi inoculado em MIB0 livre de canamicina e enriquecido com 8 mg.L⁻¹ de acetoseringona. Três dias depois, os explantes foram transferidos para meios MIB2 contendo 50 mg.L⁻¹ canamicina e 250 g.L⁻¹ timentin, além de 0,1% PPM, 2 mg.L⁻¹ de BAP e 0,1 mg.L⁻¹ de 2.4-D (item 3.1).

Após dois dias, foram observados indícios de contaminação em todas as placas da co-cultura. Portanto, o procedimento feito foi a lavagem dos explantes em água destilada contendo 0,1% PPM. Os explantes foram dispostos em uma peneira e lavados de modo corrente com a água destilada com PPM e então transferidos para outras placas de petri contendo MIB2 com 50 mg.L⁻¹. O diferencial deste meio foi a concentração de timentin, que passou a ser 500 g.L⁻¹ para evitar novas contaminações.

A contaminação observada nas placas de co-cultura são caracterizadas por contaminação intrínseca ao meristema e não a contaminação externa (Figura 5). Assim, as possibilidades de utilização de materiais contaminados ou manipulação errada foram descartadas. Dessa forma, a justificativa atribuída a tal contaminação foi à própria *Agrobacterium*, uma vez que a absorvância de 0,828 se mostra muito elevada se comparada àquelas utilizadas na literatura (entre 0,4 e 0,8).

Como o intuito do projeto foi o desenvolvimento de um protocolo para transformação genética, a absorvância de 0,828 foi a escolhida como forma de testar a resistência do capim para com as agrobactérias. Por conseguinte, a possibilidade de lavar os meristemas e reintroduzi-los em placas de petri foi vista como viável para os testes do projeto. Além disso, a justificativa encontrada para evitar futuras contaminações foi o aumento da concentração de timentin no meio de cultura.

Figura 5 – Focos de contaminação nas placas de co-cultura de capim-elefante



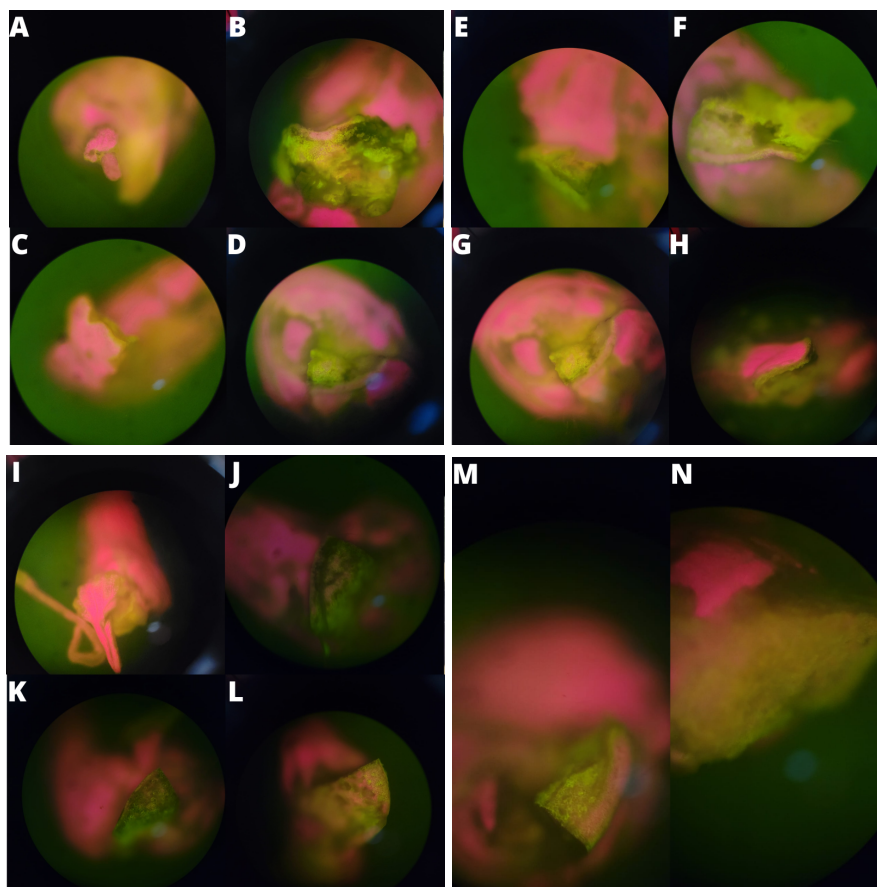
Fonte: elaborada pelo autor (2022)

Uma semana após o início da co-cultura, os explantes foram levados para o Laboratório Integrado de Pesquisa (LIP) para que os indícios de fluorescência nas amostras fossem observados no microscópio invertido.

Com apenas sete dias de co-cultura, foi possível observar indícios de fluorescência em 14 explantes do total de 45, determinando que a transformação dos brotos de capim-elefante está acontecendo da maneira que se esperava (Figura 6).

O prazo de uma semana não é visto na literatura como ideal, portanto, as amostras serão levadas novamente ao LIP para que a observação da fluorescência seja feita novamente. Entretanto, a emissão fluorescente indica que a transformação do capim-elefante foi feita com sucesso nos explantes que emitiram a luminosidade.

Figura 6 – Indícios de fluorescência em brotos de capim-elefante



Fonte: elaborada pelo autor (2022)

Os pontos verdes mais claros de luminescência indicam os pontos de transformação das células de capim-elefante. A porção rosa fluorescente aponta presença de clorofila. Considerando que os brotos de capim-elefante estavam verdes, é normal que haja muita luminescência rosa. Ainda, a luminescência rosa impede a identificação de todos os pontos de luminescência verde clara. Portanto, é possível que haja mais pontos luminescentes verdes do que foi observado.

3.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para análise de viabilidade de brotos, perfilhos, raiz e caule foram feitos testes de normalidade (Anderson-Darling, D'Agostino & Pearson, Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov) e depois os dados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas utilizando o teste Tukey a 5% de nível de significância ($p < 0,05$) no software GraphPad Prism 8.

Para a curva de seleção, foi utilizada a regressão não-linear com a fórmula $y = A1 + (A2 - A1) / (1 + 10^{((\text{LOG } x_0 - x) * p)})$ e a qualidade foi medida pelo coeficiente determinante (COD) $R^2 \geq 0,95$ com o software Origin 2019b.

4 CONCLUSÃO

Após o desenvolvimento deste trabalho, fica claro que é possível induzir brotos de capim-elefante *in vitro* e que a transformação genética via *Agrobacterium* desse capim também é uma alternativa viável.

Para tal, o meio MIB2 (0.1D2B0T) se mostrou como aquele que possui melhor resultado, associado à concentração de 50 mg.L de canamicina. Para a co-cultura, crescer as bactérias em dois dias e utilizar uma absorbância maior também pode influenciar no sucesso da transformação. Em casos de indícios de contaminação bacteriana na co-cultura, lavar os meristemas com 0,1% de PPM pela concentração de água destilada é uma possível solução até que se confirme a transformação. Em última instância, elevar a concentração de timentin a 500 g.L⁻¹ para eliminar a contaminação no meio de cultura também se mostra como uma opção viável.

Atualmente, dispomos de uma diversa gama tecnológica para aprimorar o desenrolar das técnicas aqui utilizadas, desde a pesquisa bibliográfica até o desenvolvimento final do projeto. Assim, com o auxílio de empresas focadas no desenvolvimento agropecuário, será possível levar todas as etapas aqui elaboradas para uma escala comercial, a fim de dissipar tal melhoramento, com enfoque nos pequenos produtores, os quais são os mais impactados negativamente pela ação dos insetos-praga na plantação que possuem.

Além disso, com o desenvolvimento do protocolo da indução de broto, espera-se que os próximos trabalhos que foquem nessa metodologia possam ser facilitados nessa mesma etapa.

REFERÊNCIAS

ALVARENGA, R.; AUAD, A. M.; MORAES, J. C.; SILVA, S.; RODRIGUES, B. S.; SILVA, G. B. Spittlebugs (Hemiptera: Cercopidae) and their host plants: a strategy for pasture diversification. *Applied Entomology and Zoology*, [S.I.], v. 52, n. 4, p. 653-660, 2017.

ANDRADE, S. R. M. Transformação de plantas. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2003. 28p.

ARAÚJO, A. A. Forrageiras para a ceifa. Porto Alegre: Edição Sulina, 1967 a. 160 p.

AUAD A. M., SIMÕES A. D., DERESZ F., CASTRO M. M., SOBRINHO F. S., PEREIRA A. V., BRAGA A. L. F., LEDO F. J. S., PAULA-MORAES S. V. 2006. Flutuação populacional de *Deois schach* (Fabricius, 1787) em pastagem de *Brachiaria brizantha*. In: 43a REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 2006. João Pessoa, PB. 4 p

AUAD, A. M.; SIMÕES, A. D.; PEREIRA, A. V.; BRAGA, A. L. F.; SOBRINHO, F. S.; LÉDO, F. J. S.; PAULA MORAES, S. V.; OLIVEIRA, S. A.; FERREIRA, R. B. Seleção de genótipos de capim-elefante quanto à resistência à cigarrinha-das-pastagens. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.42, n.8, p.1077-1081, 2007.

AUAD, A. M.; SIMÕES, A. D.; PEREIRA, A. V.; *et al.* Seleção de genótipos de capim-elefante quanto à resistência à cigarrinha-das-pastagens. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 42, n. 8, p. 1077–1081, 2007.

BARROS, R. A.; VITAL, C. E.; JÚNIOR, N. R. S.; *et al.* Differential defense responses of tropical grasses to *Mahanarva spectabilis* (Hemiptera: Cercopidae) infestation. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 93, n. 3, 2021.

BERNARDO, E. R. A.; ROCHA, V. F.; PUGA, O.; SILVA, R. A. Espécies de cigarrinha-das-pastagens (Hemiptera:Cercopidae) no meio-norte do Mato Grosso. *Revista Ciência Rural*, v. 33, n. 2, p. 369-371, 2003.

BRAVO, A., LIKITVIVATANAVONG, S., GILL, S. S., SOBERÓN, M. *Bacillus*

thuringiensis: a story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochem Mol Biol* v. 41, p. 423-431, 2011.

CAMPANINI, E. B.; DAVOLOS, C. C.; ALVES, E. C. C.; LEMOS, M. V. F. Isolation of *Bacillus thuringiensis* strains that contain Dipteran-specific *cry* genes from Ilhabela (São Paulo, Brazil) soil samples. *Brazilian Journal of Biology*, v.72, p.1-5, 2012.

CARDONA, C.; FORY, P.; SOTELO, G.; PABON, A.; DIAZ, G.; MILES, J. W. Antibiosis and tolerance to five species of spittlebug (Homoptera: Cercopidae) in *Brachiaria* spp.: implications for breeding for resistance. *Journal of Economic Entomology*, v.97, p.635-645, 2004.

CARVALHO, M. M. Melhoramento da produtividade das pastagens por meio da adubação. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, v. 11, p. 23-32, 1985.

CARVALHO, M. M.; ALVIM, M. J.; XAVIER, D. F.; CARVALHO, L. A. Capim-elefante: produção e utilização. 2. ed. revisada. Brasília: Embrapa-SPI Juiz de Fora, 1997.

COSENZA, G.W. et al. Resistência de gramíneas forrageiras a cigarrinha-das-pastagens. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.24, n.8, p.961-968, 1989.

DOWN, R. E.; FITCHES, E. C.; WILES, D. P.; *et al.* Insecticidal spider venom toxin fused to snowdrop lectin is toxic to the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae) and the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae). *Pest Management Science*, v. 62, n. 1, p. 77–85, 2005.

FARIA, V.P. de. Formas de uso do capim-elefante. In: SIMPÓSIO SOBRE CAPIM-ELEFANTE, 2., 1994, Coronel Pacheco. Anais... Coronel Pacheco: EMBRAPA/CNPGL, 1994. P.139-148.

FIGUEIREDO, D. M.; VALÉRIO, J. R.; BARBOSA, I. R.; CONTE, C. O.; OLIVEIRA, M. C. M. 2001. Avaliação de danos causados por adultos da cigarrinha-das-pastagens *Deois flavopicta* (Homoptera: Cercopidae) em introduções e cultivares de *Panicum maximum*. In:

SCHENK, M.A.M.; LIMA, E.C.N.Z.; CINTRA, M.A.M. de U.; COSTA, F.P. Despertando vocações: a Embrapa Gado de Corte pesquisando com estudante. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2001. p.19-20. (Embrapa Gado de Corte. Documentos, 107).

FLORES R. A. Produção de capim elefante para fins energéticos no cerrado: resposta a adubação nitrogenada e idade de corte. 2009. 66f. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2009.

FOISSAC, X.; LOC, N. T.; CHRISTOU, P.; GATEHOUSE, A. M.; GATEHOUSE, J. A. Resistance to green leaf hopper (*Nephotettix virescens*) and brown plant hopper (*Nilaparvata lugens*) in transgenic rice expressing snowdrop lectin (*Galanthus nivalis* agglutinin; GNA). *J. Insect Physiol.*, v. 46, p. 573-583, 2000.

GALLO, D., NAKANO, O., SILVEIRA NETO, S., CARVALHO, R. P. L. C., BAPTISTA, G. C., FILHO, E. B., PARRA, J. R. P., ZUCCHI, R. A., ALVES, S. B., VENDRAMIM, J. D., MARCHINI, L. C., LOPES, J. R. S., OMOTO, C. Manual de entomologia agrícola. 3.ed. Piracicaba:FEALQ, p. 920, 2002.

GRAZIA, J.; FERNANDES, J. A. M. Subordem Heteroptera. Insetos do Brasil: Diversidade e Taxonomia. Holos Editora, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil, p. 369-405, 2012.

GUSTAFSSON, C.; GOVINDARAJAN, S.; MINSHULL, J. Codon bias and heterologous protein expression. *Trends in Biotechnology*. Amsterdam, v. 22, p. 346-353, 2004.

HABTE, E.; MUKTAR, M. S.; ABDENA, A.; *et al.* Forage Performance and Detection of Marker Trait Associations with Potential for Napier Grass (*Cenchrus purpureus*) Improvement. *Agronomy*, v. 10, n. 4, p. 542, 2020.

HANDEL, C. L.; WAGNER, C. M.; MILACH, S. C. K.; FEDERIZZI, L. C. Transformação genética de cereais via *Agrobacterium tumefaciens*. *Ciência Rural*, 27:359-365, 1997.

HANNA, W. W.; Melhoramento do Capim-elefante. In: PASSOS, L.P.; CARVALHO, L.A.; MARTINS, C.E.; BRESSAN, M.; PEREIRA, A.V. (ed) *Biologia e Manejo do Capim-elefante*. Juiz de Fora, Embrapa Gado de Leite, p. 17 28, 1999.

HEWITT, G. B. Ovipositional preferences of the spittlebug *Zulia entreriana* (Berg, 1879) and *Deois flavopicta* (Stal, 1854) (Homoptera: Cercopidae). *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil, Porto Alegre*, v.14, n.2, p.197- 204, 1985.

HEWITT, G. B. Grazing management as a means of regulating spittlebug (Homoptera: Cercopidae) numbers in Central Brazil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília*, v.23, n.7, p.697- 707, 1988.

HILDER, V. A.; POWELL, K. S.; GATEHOUSE, A. M. R.; GATEHOUSE, J. A.; GATEHOUSE, L. N.; SHI, Y.; PEUMANS, W. J. Expression of snowdrop lectin in transgenic tobacco plants results in added protection against aphids. *Transgenic Res.*, v. 4, p. 18-25, 1995.

HINCHLIFFE, G.; BOWN, D. P.; GATEHOUSE, . A.; *et al.* Insecticidal activity of recombinant avidin produced in yeast. *Journal of Insect Physiology*, v. 56, n. 6, p. 629–639, 2010.

IKEMURA, T. Codon usage and tRNA content in unicellular and multicellular organisms. *Molecular Biology and Evolution, Oxford*, v. 2, p. 13-34, 1985.

ISHIDA, Y.; HIEI, Y.; KOMARI, T. Agrobacterium-mediated transformation of maize. *Nature Protocols*, v. 2, p. 1614-1621, 2007.

KOST, C.; HEIL, M. Increased availability of extrafloral nectar reduces herbivory in Lima bean plants (*Phaseolus lunatus*, Fabaceae). *Basic and Applied Ecology, Amsterdã*, v. 6, n. 3, p. 237-248, 2005.

LAPOINTE, S. L.; SERRANO, M. S.; ARANGO, G. L.; SOTELO, G.; CORDOBA, F. Antibiosis to spittlebugs (Homoptera: Cercopidae) in accessions of *Brachiaria* spp. *Journal of Economic Entomology*, v.85, p.1485-1490, 1992.

MACHADO, J.C.; PEREIRA, A.V.; LÉDO, F.J.S.; KÖPP, M.M. Recursos energéticos de *Pennisetum*. In: DAVIDE, L.C. & BENITES, F.R.G. (Ed.) *Workshop sobre Citogenética e Genética Molecular Aplicadas ao Melhoramento*. 1. ed. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite,

2016. cap. 1, p. 9-15.

MI, X.; LIU, X.; YAN, H.; *et al.* Expression of the *Galanthus nivalis* agglutinin (GNA) gene in transgenic potato plants confers resistance to aphids. *Comptes Rendus Biologies*, v. 340, n. 1, p. 7–12, 2017.

PEREIRA, A. V. Escolha de variedades de capim elefante. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DA PASTAGEM, 16., 1992, Piracicaba. Anais... Piracicaba: FEALQ, 1992. p. 47- 62.

PEREIRA, A. V.; SOBRINHO, F. S.; SOUZA, F. H. D.; LÊDO, F. J. S. Tendências do melhoramento genético e produção de sementes de forrageiras no Brasil. In: VII SIMPÓSIO SOBRE ATUALIZAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS. Tema: "Melhoramento de Plantas e produção de sementes no Brasil", 2003. Lavras. Anais... Lavras (MG): UFLA, 2003. p. 23-35.

PEREIRA, A. V.; LÊDO, F. J. S.; MACHADO, J. C.; BARBOSA, S. BRS Kurumi and BRS Capiaçú - New elephant grass cultivars for grazing and cut-and-carry system. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, Viçosa, v. 17, p. 59-62, 2017.

RAO, K. V.; RATHORE, K. S.; HODGES, T. K.; FU, X.; STOGER, E.; SUDHAKAR, D. Expression of snowdrop lectin (GNA) in transgenic rice plants confers resistance to rice brown plant hopper. *Plant J.*, v. 15, p. 469-477, 1998.

SANTANA, R. C.; BARROS, N. F.; NEVES, J. C. L. Eficiência de utilização de nutrientes e sustentabilidade da produção em procedências de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus saligna* em sítios florestais do estado de São Paulo. *Revista Árvore*, v.26, n.4, p.447-457, 2002.

SOUZA, J.C.; SILVA, R.A.; REIS, P.R.; QUEIROZ, D.S.; SILVA, D.B. Cigarrinhas-das-pastagens: Histórico, bioecologia, prejuízos, monitoramento e medidas de controle. Empresa Agropecuária de Minas Gerais, 2008. (Epamig, Circular Técnica, 42).

SUGANTHI, M.; SENTHILKUMAR, P.; ARVINTH, S.; *et al.* Chitinase from *Pseudomonas fluorescens* and its insecticidal activity against *Helopeltis theivora*. *The Journal of General and Applied Microbiology*, v. 63, n. 4, p. 222–227, 2017.

VALÉRIO, J.R.; JELLER, H.; PEIXER, J. Seleção de introduções do gênero *Brachiaria* (Griseb) resistentes à cigarrinha *Zulia entreciana* (Berg) (Homoptera: Cercopidae). In: Anais da Sociedade Entomológica do Brasil, v.26, p.383-387, 1997.

WAR, A. R.; PAULRAJ, M. G.; AHMAD, T.; BUHROO, A. A.; HUSSAIN, B.; IGNACIMUTHU, S.; SHARMA, H. C. Mechanisms of plant defense against insect herbivores. *Plant Signaling & Behavior*, v. 7, n. 10, p. 1306-1320, 2012.

APÊNDICE A - Tabela compilada das proteínas registradas na revisão bibliográfica

ANEXO – Compilação das informações coletadas na revisão literária

Proteína	Espécie que produz a proteína	Espécie de hemíptero que foi estudada	Impacto da proteína no inseto	Índice de mortalidade	Referência
Aalt/GNA	<i>Galanthus nivalis</i>	<i>Bemisia tabaci</i>	morte e reduz fecundidade	~ 50%	Liu et al., 2015
Aglutinina AAA	<i>Allium altaicum</i>	<i>Aphis gossypii</i>	hemaglutinação	~ 40%	Upadhyay et al., 2011
Aglutinina ASAL	<i>Allium sativum</i>	<i>Lipaphis erysimi</i>	toxicidade e morte	31,25 - 87,5%	Bandyopadhyay et al., 2001
Aglutinina ASAL	<i>Allium sativum</i>	<i>Dysdercus cingulatus</i>	toxicidade e morte	50 - 100%	Bandyopadhyay et al., 2001
Aglutinina CEA	<i>Colocasia esculenta</i>	<i>Bemisia tabaci</i>	morte e reduz fecundidade	não disponível	Roy et al., 2014
Aglutinina CEA	<i>Colocasia esculenta</i>	<i>Lipaphis erysimi</i>	morte e reduz fecundidade	não disponível	Roy et al., 2014
Aglutinina CEA	<i>Colocasia esculenta</i>	<i>Lipaphis erysimi</i>	morte e reduz fecundidade	70 - 81.67%	Das et al., 2018
Aglutinina PTA	<i>Pinellia ternata</i>	<i>Myzus persicae</i>	informação não disponível	> 90%	Yao et al., 2003
Aglutinina PTA	<i>Pinellia ternata</i>	<i>Myzus persicae</i>	reduz fecundidade	> 80%	Jin et al., 2011
Aglutinina PTA	<i>Pinellia ternata</i>	<i>Myzus persicae</i>	morte e reduz fecundidade	61%	Qi et al., 2011

Aglutinina RSA	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	destruição do tecido intestinal e morte	não disponível	Hamshou et al., 2013
Aglutinina SNA-I	<i>Sambucus nigra</i>	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	morte e reduz fecundidade	100%	Shahidi-Noghabi et al., 2008
Aglutinina SNA-I	<i>Sambucus nigra</i>	<i>Myzus persicae</i>	morte e reduz fecundidade	não disponível	Shahidi-Noghabi et al., 2008
Aglutinina SSA	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	toxicidade e morte	100%	Hamshou et al., 2010
Aglutinina ZGA	<i>Zephyranthes grandiflora</i>	<i>Myzus nicotianae</i>	morte e reduz fecundidade	não disponível	Ye et al., 2008
AprA	<i>Pseudomonas entomophila</i>	<i>Riptortus pedestris</i>	citotoxicidade a hemócitos	~ 80%	Lee et al., 2018
Avidina recombinante	<i>Gallus gallus</i>	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	toxicidade aguda e morte	100%	Hinchiliffe et al., 2010
Asparaginase	<i>Zea mays</i>	<i>Bemisia tabaci</i>	neurotoxicidade	95%	Gul et al., 2020
Canatoxina (CNTX)	<i>Canavalia ensiformis</i>	<i>Dysdercus peruvianus</i>	morte e reduz desenvolvimento	> 90%	Stanisçuaski et al., 2005
Concanavalina A	<i>Canavalia ensiformis</i>	<i>Rhopalosiphum padi</i>	morte e reduz fecundidade	~ 75%	Sprawka et al., 2014
Concanavalina A	<i>Canavalia ensiformis</i>	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	toxicidade e morte	não disponível	Sauvion et al., 2004
crisantemol sintase (CHS)	<i>Tanacetum cinerariifolium</i>	<i>Aphis gossypii</i>	reduz a fecundidade	não disponível	Hu et al., 2018

Cry1Ac:ASAL	<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Nilaparvata lugens</i>	reduz fertilidade	70 - 80%	Boddupally et al., 2018
D-galactose:XC L	<i>Xerocomellus chrysenteron</i>	<i>Myzus persicae</i>	morte e reduz fecundidade	100%	Jaber et al., 2008
D-glicose:XCL	<i>Xerocomellus chrysenteron</i>	<i>Myzus persicae</i>	morte e reduz fecundidade	100%	Jaber et al., 2008
D-manose:XCL	<i>Xerocomellus chrysenteron</i>	<i>Myzus persicae</i>	morte e reduz fecundidade	100%	Jaber et al., 2008
defensina BrD1	<i>Brassica rapa</i>	<i>Nilaparvata lugens</i>	informação não disponível	100%	Choi et al., 2009
fitohemaglutinina (PHA)	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Sitobion avenae</i>	reduz fecundidade	não disponível	Sprawka et al., 2012
GalNAc:XCL	<i>Xerocomellus chrysenteron</i>	<i>Myzus persicae</i>	morte e reduz fecundidade	100%	Jaber et al., 2008
GNA	<i>Galanthus nivalis</i>	<i>Rhopalosiphum maidis</i>	morte de ninfas	36%	Wang et al., 2005
GNA:CaMV 35S	<i>Galanthus nivalis</i>	<i>Myzus persicae</i>	reduz a fertilidade	20-50%	Mi et al., 2017
GNA:ST-LS1	<i>Galanthus nivalis</i>	<i>Myzus persicae</i>	reduz a fertilidade	45-55%	Mi et al., 2017
Hv1a/GNA	<i>Hadronyche versuta</i>	<i>Myzus persicae</i>	toxicidade oral e morte	100%	Yang et al., 2014
IF8	<i>Isaria fumosorosea</i>	<i>Diaphorina citri</i>	toxicidade e morte	> 80%	Keppanan et al., 2019

Jaburetox	<i>Canavalia ensiformis</i>	<i>Rhodnius prolixus</i>	morte e impacto fisiológico	não disponível	Fruttero et al., 2016
Lectina ASA-I	<i>Allium sativum</i>	<i>Dysdercus koenigii</i>	morte e impacto fisiológico	> 70%	Roy et al., 2002
Lectina ASA-I	<i>Allium sativum</i>	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	toxicidade aguda e crônica	100%	Fitches et al., 2008
Lectina ASA-II	<i>Allium sativum</i>	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	toxicidade aguda e crônica	100%	Fitches et al., 2008
Lectina ASAL	<i>Allium sativum</i>	<i>Nilaparvata lugens</i>	morte e impacto fisiológico	36%	Saha et al., 2006
Lectina ASAL	<i>Allium sativum</i>	<i>Nephotettix virescens</i>	morte e impacto fisiológico	32%	Saha et al., 2006
Lectina ASAL	<i>Allium sativum</i>	<i>Aphis craccivora</i>	morte e reduz fecundidade	66 - 83%	Chakraborti et al., 2009
Lectina ATL	<i>Arum maculatum</i>	<i>Aphis craccivora</i>	toxicidade e morte	7,5 - 55%	Majumder et al., 2005
Lectina ATL	<i>Arum maculatum</i>	<i>Lipaphis erysimi</i>	toxicidade e morte	12,5 - 50%	Majumder et al., 2005
Lectina CEA	<i>Colocasia esculenta</i>	<i>Dysdercus koenigii</i>	morte e impacto fisiológico	50%	Roy et al., 2002

Lectina DEA	<i>Dieffenbachia sequina</i>	<i>Dysdercus koenigii</i>	morte e impacto fisiológico	~ 40%	Roy et al., 2002
Lectina PeCL	<i>Penicillium chrysogenum</i>	<i>Myzus persicae</i>	toxicidade e morte	> 60%	Francis et al., 2011
Lectina XCL	<i>Penicillium chrysogenum</i>	<i>Myzus persicae</i>	morte e reduz fecundidade	100%	Jaber et al., 2007
Lectina WsMBP1	<i>Withania somnifera</i>	<i>Probergrothius sanguinolens</i>	morte de ninfas	96,7%	George et al., 2018
MDUSTBa15	<i>Xenorhabdus nematophilus</i>	<i>Ferrisia virgata</i>	toxicidade e morte	82,5 - 87,5%	Hemalatha et al., 2018
Orysata	<i>Oryza sativa</i>	<i>Myzus persicae</i>	toxicidade e morte	50 - 63%	Al Atalah et al., 2014
Orysata	<i>Oryza sativa</i>	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	morte de ninfas	~ 90%	Al Atalah et al., 2014
P11a/GNA	<i>Pireneitega luctuosus</i>	<i>Myzus persicae</i>	paralisa e morte	100%	Yang et al., 2014
proteína CytCo	<i>Conidiobolus obscurus</i>	<i>Takecallis taiwanus</i>	informação não disponível	não disponível	Wang et al., 2020
proteína derivada	<i>Lecanicillium lecanii</i>	<i>Myzus persicae</i>	morte e reduz fecundidade	41 - 54%	Hanan et al., 2019
proteína do micélio	<i>Lecanicillium lecanii</i>	<i>Diaphorina citri</i>	sem sintomas	> 80%	Keppanan et al., 2019
proteína sobrenatante	<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Aphis gossypii</i>	toxicidade e morte	> 80%	Kim et al., 2010

quitinase	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Helopeltis theivora</i>	destruição do tecido intestinal e morte	100%	Suganthi et al., 2017
quitinase termotolerante	<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Aphis gossypii</i>	toxicidade e morte	não disponível	Kim et al., 2010
SFI1/GNA	<i>Segestria florentina</i>	<i>Nilaparvata lugens</i>	morte	100%	Down et al., 2005
SFI1/GNA	<i>Segestria florentina</i>	<i>Myzus persicae</i>	reduz fertilidade	84%	Down et al., 2005
SLP1	<i>Streptomyces laindensis</i>	<i>Lipaphis erysimi</i>	informação não disponível	100%	Xu et al., 2016
Tma12	<i>Tectaria macrodonta</i>	<i>Bemisia tabaci</i>	reduz fertilidade	> 90%	Shukla et al., 2016
U-MYRTX-MANr1	<i>Manica rubida</i>	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	morte e reduz fecundidade	93%	Heep et al., 2019
Urease	<i>Canavalia ensiformis</i>	<i>Dysdercus peruvianus</i>	toxicidade e morte	> 80%	Real-Guerra et al., 2013
Urease	<i>Canavalia ensiformis</i>	<i>Oncopeltus fasciatus</i>	toxicidade e morte	> 80%	Defferrari et al., 2011
Urease	<i>Canavalia ensiformis</i>	<i>Dysdercus peruvianus</i>	toxicidade e morte	80%	Follmer et al., 2005
Urease	<i>Canavalia ensiformis</i>	<i>Rhodnius prolixus</i>	toxicidade e morte	~ 100%	Defferrari et al., 2014
v-ATPaseA	feito em laboratório	<i>Nilaparvata lugens</i>	toxicidade e morte	34 - 83%	Thakur et al., 2014

Veneno bruto	<i>Manica rubida</i>	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	morte e reduz fecundidade	100%	Heep et al., 2019
Xbpi-1	<i>Xenorhabdus bovienii</i>	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	toxicidade e morte	80%	Jin et al., 2014

Fonte: elaborada pelo autor (2022).

APÊNDICE B - Publicação da primeira parte do trabalho a respeito da revisão de proteínas de ação inseticida

<https://www.embrapa.br/gado-de-leite/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1134180/col-etanea-de-iniciacao-cientifica-da-embrapa-gado-de-leite---pibic-cnpq-2020-2021>

APÊNDICE C - Protocolo para indução de brotos de capim-elefante e co-cultura para transformação via *Agrobacterium*

MIB2

Produto	Quantidade
MS com vitaminas	4,4 g.L ⁻¹
Sacarose	30 g.L ⁻¹
Ágar*	6 g.L ⁻¹
PPM 0,1%	1 ml.L ⁻¹
Timentin 200 mg.L ⁻¹	200 mg.L ⁻¹
2,4-D	0,1 mg.L ⁻¹
BAP	2 mg.L ⁻¹

*Deve ser pesado à parte.

O pH do meio deve ser corrigido a 5,7-5,8. Depois, adicione a solução ao ágar, misture e leve ao microondas por 2,5 minutos (1 minuto para cada 100 ml). Por fim, leve ao autoclave por 20 minutos a 121 °C.

CO-CULTURA

MEIO LB

Produto	Quantidade
Triptona 10 g.L ⁻¹	2,5 g
Extrato de levedura 5 g.L ⁻¹	1,25 g
NaCl 10 g.L ⁻¹	2,5 g
Água destilada	250 ml

O pH do meio deve ser corrigido a 7,4. Depois, leve ao autoclave por 20 minutos a 121 °C. Após retirar do autoclave, passe o meio para um tubo de Falcon e adicione os antibióticos:

Rifampicina	50 mg.L ⁻¹
Gentamicina	30 mg.L ⁻¹
Estreptomicina	25 mg.L ⁻¹

Adicionar a *Agrobacterium*, colocar o tubo de Falcon em um *shaker* e deixar crescer por 2 dias.

Após 2 dias, centrifugue o tubo de Falcon com a *Agrobacterium* por 30 minutos. Transfira o pelet para um MIB0 líquido (sem ágar), corte os brotos dos meristemas induzidos ao meio e adicione-os ao MIB0 líquido com a *Agrobacterium*, coloque o tubo de Falcon em um *shaker* e deixe por 40 minutos.

Lave os meristemas com água destilada em PPM 0,1% e inocule-os em MIB2 sem canamicina.

Após 3 dias, transfira os brotos para MIB2 com 50 mg.L⁻¹ de canamicina.