

RESISTÊNCIA DE PLANTAS A INSETOS

Inibidores de enzimas digestivas e a obtenção de plantas resistentes

1. Introdução

As pragas e os patógenos (fungos, bactérias e vírus) são responsáveis por grandes perdas da agricultura, por causarem injúrias e doenças, além de se alimentarem dos tecidos de plantas. As perdas na produção da agricultura mundial, devido ao ataque de pragas e doenças, chegam a 37%, sendo 13% dessa perda causada por insetos (Gat-house *et al.*, 1992). As plantas possuem entretanto, um certo grau de resistência a insetos e, há muitos anos, tem-se estudado a biossíntese e a regulação de compostos químicos de plantas associados com essas defesas. Atualmente, sabe-se que esses defensivos são

ser obtidos de plantas, bactérias ou de outra origem (Walker *et al.*, 1997). Os inibidores de enzimas (α -amilases e de proteínas) serão aqui descritos e estudados, relacionando-se suas funções como compostos de defesas de plantas contra insetos e seu potencial como ferramenta na obtenção de plantas resistentes a pragas.

2. Inibidores de α -Amilase

As α -amilases são enzimas monoméricas que constituem uma família de endoamilases e catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas α -1,4 do amido, glicogênio e outros carboidratos. Essas enzimas têm um papel importante no

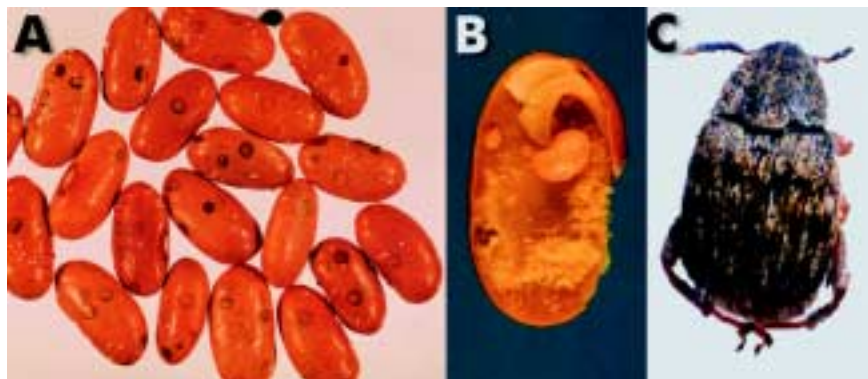


Figura 1 – A) Feijões infestados por *A. obtectus*. B) Feijões danificados por larvas de *A. obtectus* e C) Inseto adulto

Octávio Luiz Franco^{1,2}
Francislete Rodrigues Melo^{1,2}
Maria Cristina Mattar da Silva^{1,2}
Maria Fátima Grossi de Sá¹

¹Cenargen/Embrapa

²Universidade de Brasília,
Depto. de Biologia Celular, Brasília,
DF, Brasil.

fatimasa@cenargen.embrapa.br

encontrados em vários tecidos vegetais e entre esses compostos estão incluídos antibióticos, alcalóides, terpenos e proteínas. Entre as proteínas, estão incluídas enzimas tais como as quitinases, as lectinas e os inibidores de enzimas digestivas (Ryan, 1990). Atualmente, genes que conferem resistência a insetos podem ser introduzidos em plantas de interesse para reduzir sua susceptibilidade. Esses genes podem

metabolismo de carboidratos em plantas, animais e outros organismos. Por serem essenciais para o crescimento e o desenvolvimento de muitos insetos, especialmente daqueles que vivem em sementes e grãos ricos em amido, muitos estudos têm sido feitos no intuito de desvendar o funcionamento das α -amilases (Grossi de Sá & Chrislpeels, 1997, Chrispells *et al.* 1988, Da Silva *et al.*, 1999) e de descobrir proteínas com

função inibitória a essas enzimas digestivas de insetos. As plantas apresentam várias proteínas com essa função e, portanto, são denominadas inibidores de α -amilase. Esses inibidores podem ser encontrados em cereais (Feng *et al.*, 1996; Franco *et al.*, 1999), em leguminosas (Ishimoto *et al.*, 1996, Grossi de Sá *et al.*, 1997) e em outras famílias de vegetais. Estes inibidores podem apresentar massa molecular de 5 kDa, 13 kDa (monômeros), 26 kDa (dímeros) e 50 kDa (tetrâmeros). Entre os inibidores de α -amilase mais estudados estão os encontrados no trigo (*Triticum aestivum*): 0.19 e 0.53, nomeados de acordo com sua mobilidade eletroforética, e os inibidores do feijão comum (*Phaseolus vulgaris*). No feijão, foi demonstrada a presença de dois inibidores de α -amilase, chamados α -AI1 e α -AI2, que diferem em suas especificidades contra diferentes α -amilases. Enquanto o α -AI1 inibe α -amilase de pâncreas de porco (PPA) assim como as α -amilases dos bruquídeos *Callosobruchus maculatus* (CMA) e de *Callosobruchus chinensis* (CCA) (Kasahara *et al.*, 1996), o inibidor α -AI2 inibe as α -amilases do *Zabrotes subfasciatus* (ZSA) (Grossi de Sá and Chrispels, 1997). Nenhum desses inibidores presentes em sementes de feijão teve efeito contra as α -amilases do bruquídeo *Acanthoscelides obtectus* (AOA).

Três importantes bruquídeos-pestes de grãos armazenados de feijão *Z. subfasciatus*, *C. maculatus* e *A. obtectus* (**Figura 1**) são responsáveis por perdas substanciais na agricultura do Brasil, América Latina e parte central da África. As larvas desses bruquídeos penetram dentro da semente apesar da presença de fatores de resistência, tais como inibidores de α -amilase e proteinase. Isso pode ser explicado pela teoria da co-evolução (Ehrlich & Raven, 1964) que sugere que a produção e o acúmulo de uma toxina pela planta é seguido por uma resposta do predador, tal como a detoxificação ou a excreção da toxina. Esse fato capacitaria o inseto a se alimentar da planta alvo.

Com o intuito de identificar inibidores ativos e específicos contra as α -amilases de tais bruquídeos, o inibidor 0.53 foi purificado a partir de sementes de trigo (*T. aestivum*) cv BR35. As sementes foram maceradas e as

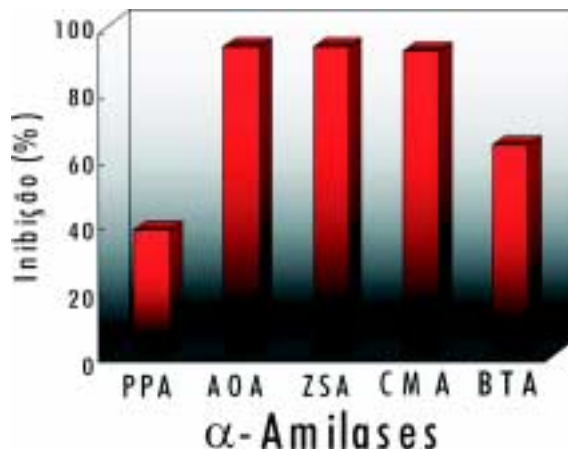
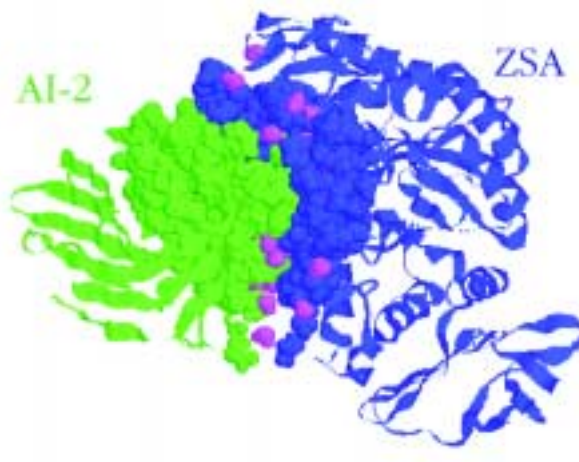


Figura 2: Atividade inibitória de 300 μ g de 0.53 contra 6,0 UI de α -amilases de pâncreas de porco (PPA), *C. maculatus* (CMA), *Z. subfasciatus* (ZSA), *A. obtectus* (AOA) e *Bacillus amyloliquefasciens* (BTA). Cada UI equivale ao incremento de 0,1 de absorbância a 530nm

proteínas extraídas com uma solução de NaCl 0,15 M (1:5 p/v), seguido do fracionamento com sulfato de amônio (20-40%). Essa fração foi, então, aplicada em uma coluna HPLC semi-preparativa de fase reversa (Vydac 218 TP 1022 C-18). O ensaio inibitório (**Figura 2**) feito de acordo com Bernfeld (1964) mostra que

Figura 3: Complexo entre α -amilase de *Zabrotes subfasciatus* (ZSA) e inibidor 2 (AI-2). Os círculos preenchidos (cor azul e cor verde) representam os resíduos envolvidos na interação entre ambas as moléculas. Os círculos cor-de-rosa representam as moléculas de água envolvidas na interface da interação



o inibidor dimérico 0.53 é ativo contra as α -amilases de *Bacillus amyloliquefasciens* e contra α -amilases CMA, ZSA, AOA (Franco *et al.*, 1999). Esse inibidor, entretanto, apresentou baixa atividade contra a α -amilase do pâncreas de porco (PPA). O inibidor 0.53, juntamente com o 0.19 (Franco *et al.*, 1999) são os únicos fatores de resistência ativos contra o bruquídeo *A. obtectus* descritos até o momento.

O mecanismo de interação e especificidade inibidor-amilase é extremamente complexo e, embora ainda totalmente não desvendado, alguns avanços têm sido demonstrados nessa área. Recentemente, Grossi de Sá *et al.* (1997) mostraram que a inibição de ZSA, causada pelo α -AI2, é dependente tanto do tempo quanto do pH. Em adição, La Jolo *et al.* (1991) demonstrou que a formação do complexo tem pH ótimo de 5,5 e inibem assim as α -amilases de alguns Coleópteros, os quais possuem um pH ácido em seu intestino médio, e não inibem as α -amilases de Lepidópteros, que possuem um pH alcalino em seu intestino médio. Kasahara *et al.* (1996) sugeriram uma proporção estequiométrica de 2:1, onde uma única molécula de inibidor α -AI1, através de dois sítios de ligação independentes, se liga e inibe duas moléculas de amilase de PPA.

Para melhor compreender a especificidade da interação entre as α -amilases e os inibidores, estudos das estruturas moleculares vêm sendo realizados por diferentes grupos. Utilizando-se dos dados de cristalografia do complexo α -AI1/PPA (Bompard-Gilles *et al.*, 1996) e da α -amilase de *Tenebrio molitor* (TMA), através de técnicas de modelagem molecular, foi possível a obtenção de modelos estruturais que simulam a formação dos complexos encontrados na natureza, tais como o inibidor α -AI2 a α -amilase de *Z. subfasciatus* (α -AI2/ZSA) (**Figura 3**). Estruturas de complexos imaginários, tais como α -AI2-PPA e α -AI1-ZSA, também foram modeladas para possibilitar análises comparativas quanto às diferenças de especificidade. A conclusão dessas análises apontou alguns aminoácidos que podem ser responsáveis por determinadas especificidades (Da Silva *et al.*, 1999). Nosso grupo tem trabalhado na

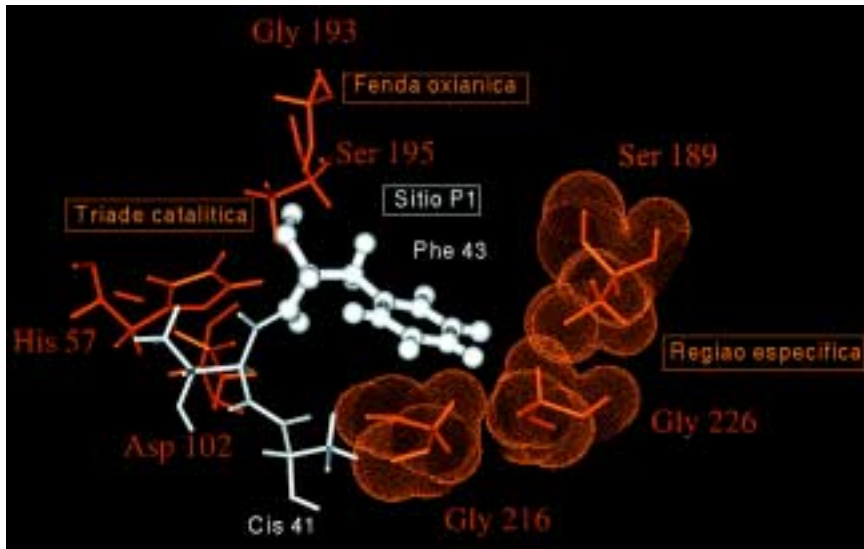


Figura 4: Inibidores de protease serínica (PFSD) var. “Fogo na Serra” extraído de *P. vulgaris*, mostrando elementos essenciais para catálise. Os círculos pontilhados referem-se a representação das forças de Van der Waals. Carvalho *et al.*, (1996)

obtenção e expressão de inibidores mutantes com função inseticida.

3. Inibidores de Proteinases

As proteinases são denominadas endopeptidases quando hidrolizam liga-

ções peptídicas internas, e exopeptidases quando hidrolizam ligações N-terminais ou C-terminais. As endopeptidases são também conhecidas como proteinases. As proteinases são classificadas, de acordo com a União Internacional de Bioquímica, em quatro grandes classes: proteinases serínicas; cisteínicas; aspár-

gicas e metalo-proteinases. O sistema de classificação baseou-se numa comparação entre sítios ativos, mecanismos de ação e estrutura tridimensional das proteinases (Neurath, 1996). Os insetos obtêm muitos dos aminoácidos essenciais utilizando proteinases extracelulares que atuam no lúmen do intestino deles. As mais bem estudadas são as proteinase serínicas, muito frequentes em várias classes de insetos e que se assemelham à tripsina e à quimotripsina de mamíferos (Applebaum *et al.*, 1985). As proteinases cisteínicas também são enzimas digestivas importantes para os insetos, como os Coleópteros *C. maculatus* e *A. obtectus* (Xavier-Filho *et al.*, 1992).

Muitas famílias de plantas possuem inibidores de proteinases encontradas em seus órgãos reprodutivos, órgãos de reserva e tecidos vegetativos. A maioria desses inibidores são moléculas pequenas, estáveis, abundantes e fáceis de purificar, podendo atuar como proteínas de reserva, como reguladores de enzimas endógenas e podem também estar envolvidos nos processos de defesa de plantas contra o ataque de pragas e/ou patógenos (Walker *et al.*, 1997). O mecanismo pelo qual os inibidores de proteinases interferem no processo digestivo dos insetos se deve à diminuição da

TABELA 2. Plantas transgênicas expressando genes para inibidores de proteinases

PLANTA	GENES	INSETO
Tabaco	CpTI Pot PI II CpTI NaPI	<i>Heliothis virescens</i> <i>Lepdoptera</i> <i>Heliothis virescens</i> <i>Helicoverpa punctigera</i>
Batata	CpTI	<i>Lacanobia oleracea</i>
Tomate	Pot PI I, Pot PI II	<i>Helicoverpa armigera</i> <i>Teleogryllus commodus</i>
Arroz	Pot PI II, CpTI	<i>Sesamia inferens</i> <i>Chilo suppressalis</i>
Morango	CpTI	<i>Otiorhynchus sulcatus</i>
Alface	Pot PI II	<i>T. commodus</i>
Canola	OC-I CII	<i>Coleoptera</i> <i>Lepdoptera, Diptera</i>
Maçã	CpTI	<i>Cydia pomonella</i>
Álamo	OC-I CII	<i>Chrysomela tremulae</i> <i>Lepdoptera</i>

CII = inibidor de protease serínica de soja; CpTI = inibidor de tripsina de feijão-de-corda; NaPI = inibidor de protease de *Nicotiana glauca*; OC I = inibidor de cisteína de arroz; Pot PI I = inibidor de proteinase I de batata; Pot PI II = inibidor de proteinase II de batata

Tabela 1: Plantas resistentes a insetos obtidas pela expressão de inibidores de α -amilase

PLANTAS	GENE	FORTE	INSETO-ALVO	AUTORES
<i>Pisum sativum</i>	α -AI	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>C. maculatus</i> <i>C. chinensis</i>	Shade <i>et al.</i> (1994)
<i>Pisum sativum</i>	α -AI	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>B. pisorum</i>	Schroeder <i>et al.</i> (1995)
<i>Vigna angustifolia</i>	α -AI	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>C. chinensis</i> <i>C. maculatus</i> <i>C. analis</i>	Ishimoto <i>et al.</i> (1996)
Tabaco	α --AI	<i>Triticum aestivum</i>	<i>A. ipsilon</i> <i>Spodoptera ssp.</i>	Gatehouse <i>et al.</i> (1998)

assimilação de nutrientes. Quando insetos são submetidos a uma dieta artificial que contenha inibidores específicos para a principal classe de proteinases de seus intestinos, estes têm seu crescimento e desenvolvimento retardados, bem como podem apresentar índices de mortalidade bastante significantes (McManus & Burgess 1995). O número de inibidores de proteinases de plantas identificados e isolados é grande, sendo os inibidores de proteinases serínicas e cisteínicas os que apresentam melhor caracterização.

Os inibidores de proteinases serínicas foram encontrados inicialmente em órgãos de reserva de plantas, tais como sementes e tubérculos, mas, posteriormente, foram detectados em folhas e frutos (Xavier-Filho, 1992). A maioria dos inibidores de proteinases serínicas reagem com suas enzimas cognatas através de um mecanismo semelhante ao que ocorre na ligação entre enzima e substrato (Grutter *et al.*, 1990). Esse grupo de inibidores “canônicos” compreendem, geralmente, proteínas pequenas com 29 a 190 resíduos de aminoácidos e todas elas possuem uma alça ligante exposta (Bode & Huber, 1992). A formação do complexo enzima-inibidor ocorre rapidamente, mas a sua dissociação é lenta e resulta na enzima livre e em um inibidor clivado, o qual sofre desnaturação. Os elementos envolvidos nas interações entre as cadeias do inibidor e as da proteinase são pontes de hidrogênio, forças de Van der Waals e pontes dissulfeto, entre outras. A formação do complexo enzima-inibidor envolve ainda a formação de uma ligação peptídica (sítio reativo, P1) no inibidor e a presença de alguns elementos essenciais no sítio ativo da enzima. Omecanismo da catálise é comum para as proteinases em geral e a estrutura foi bastante estudada por meio de técnicas de Difração de

Raios-X. A **Figura 4** exemplifica esse mecanismo, usando o modelo estrutural do inibidor de Tripsina e Quimotripsina (PFSI) de sementes de *P. vulgaris* (Carvalho *et al.*, 1996) complexado com a enzima α -Quimotripsina. O modelo ilustra a orientação do sítio reativo (P1), correspondente ao aminoácido (Fenilalanina) em relação aos demais elementos necessários para a catálise enzimática. Esses elementos são constituídos pela tríade catalítica, a região específica S1 e a fenda oxianônica. A tríade catalítica representa a base para a interação e é formada pelos aminoácidos (Ácido Aspártico, Histidina e Serina). A região específica S1, formada por aminoácidos de enzima que determinam a especificidade e a interação com os demais aminoácidos que estão ao redor de uma fenda oxianônica, que é constituída por resíduos, que podem formar pontes de hidrogênio com o átomo de oxigênio (carregado negativamente) do carbono carbonil (C1) do inibidor.

Os inibidores de proteinases cisteínicas, também conhecidos como cistatinas, são um grupo de proteínas que se ligam às proteinases cisteínicas inibindo sua atividade. Em animais, existem três famílias de cistatinas classificadas de acordo com sua massa molecular, número de pontes dissulfeto, localização subcelular e estrutura primária. São elas: família das cistatinas I, cistatinas II e kininogênicos (Ryan *et al.*, 1998). Em plantas as cistatinas de arroz (oryzacistatinas) são as mais bem caracterizadas. As cistatinas de plantas podem ser classificadas dentro da família de fitocistatinas (Abe *et al.*, 1987). Muitas fitocistatinas têm suas seqüências de aminoácidos conhecidas e em todas essas seqüências encontra-se uma região altamente conservada no sítio de ligação (Gln, Val, Val, Ala e Gly). Assim como os inibidores de proteinases serínicas, as cistatinas se

ligam reversivelmente às proteinases. Por meio de estudos de cristalografia, foi determinado que as cistatinas são formadas por uma longa α -hélice central envolvida por cinco folhas β -antiparalelas. Na extremidade das folhas β , uma alça em forma de grampo, formada pela seqüência altamente conservada em todas as cistatinas (QVVAG) é exposta. Essa seqüência corresponde ao sítio de ligação da cistatina à proteinase (papaína). Em regiões paralelas a esta alça, existe outra alça, também em forma de grampo, e uma projeção do segmento N-terminal. Várias pontes de hidrogênio são estabelecidas e a ligação é canônica, ou seja, ocorre de maneira similar à ligação do substrato à proteinase. Entretanto, como a cistatina não se liga diretamente a resíduos do sítio catalítico da proteinase, e a mesma não sofre a clivagem que o substrato natural da enzima sofreria (Bode e Huber, 1992).

6. Plantas Transformadas com Genes de Inibidores de α -amilase e protease.

A transferência de genes pode ser considerado um passo crucial no desenvolvimento de plantas resistentes a insetos. Nesse sentido, os inibidores de α -amilase e de proteinase apresentam grande potencial por reduzirem ou impedirem a atividade das enzimas digestivas dos insetos, causando-lhes desnutrição e redução do desenvolvimento larval. Dependendo dos níveis de expressão, os inibidores podem causar a morte das larvas dos insetos. A proteção eficiente contra insetos em plantas transformadas demanda que os inibidores sejam acumulados em células vegetais em um nível maior do que em plantas não transformadas (Augustyniak *et al.*, 1997). A introdução de genes que codificam inibidores de α -amilase em culturas eco-

nomicamente importantes tem sido utilizada para aumentar a resistência destas culturas a diferentes insetos (Tabela 1).

Ervilhas transformadas com o gene que codifica o α -AII se apresentaram completamente resistentes ao besouro da ervilha *Bruchus pisorum*, um bruquídeo-praga que se alimenta das ervilhas que estão em crescimento no campo (Shade *et al.*, 1994). De posse desses resultados, Ishimoto *et al.* (1996), utilizando esse mesmo gene, obteve feijões azuki resistentes contra *C. chinensis* (Tabela 1).

Em 1987, Hilder e colaboradores obtiveram a primeira planta transgênica que expressava um gene de inibidor de proteinase. Eles construíram plantas de tabaco contendo o gene que codifica para o inibidor de proteinase serínica de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*). Essas plantas que são susceptíveis ao inseto *Heliothis virescens* adquiriram altos níveis de resistência ao mesmo, e em estudos subsequentes, plantas resistentes foram obtidas contra os insetos *Lacanobia oleracea* e *Otiobrychus sulcatus*. (Gatehouse e Gatehouse, 1998). Desde então, muitas outras plantas de interesse comercial foram transformadas com genes de inibidores de proteinases. Algumas delas estão apresentadas na Tabela 2.

Em 1995, Puztai e colaboradores mostraram que ratos, alimentando-se de dietas baseadas em sementes de leguminosas cruas, apresentavam uma diminuição na digestão de amido, proteínas e lipídeos, devido à presença de fatores anti-nutricionais. Em estudos posteriores ervilhas transgênicas expressando α -AII foram utilizadas em análises de digestão em ratos, e a redução na digestão e na absorção dos nutrientes causada por estas ervilhas não foi significativa (Puztai *et al.*, 1999).

A utilização de genes que codificam inibidores de enzimas digestivas para a obtenção de plantas resistentes contra o ataque de insetos é uma estratégia bastante promissora. Entretanto, estes inibidores devem ser selecionados levando-se em consideração a fisiologia e a bioquímica de sua digestão pelo inseto. É importante também fazer uso de combinações desses inibidores com outras proteínas que induzem estresse ou inibem o crescimento dos insetos a serem controlados. Apesar da polêmica, as leguminosas transgênicas são seguras para a alimentação desde que as sementes sejam cozidas ou processadas antes do consumo por seres humanos. Uma vez desnaturados, estes inibidores não funcionam como anti-nutrientes, mas sim como fonte de aminoácidos após a digestão, assim como as proteínas de armazenamento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abe, K., Emori, Y., Kondo, H., Suzuki, K. & Arai, S. (1988). **Journal of Biological Chemistry**, 263 (16), 7655-9.
- Applebaum, S. W. (1985). Biochemistry of Digestion. In: **Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Farmacology**, eds., Kerkut, G. A. & Gilbert, L. I. New York, 4, 279- 311.
- Augustyniak, J. Dabert, M. & Wypijewski, K. (1997). **Acta Physiol. Plant.**, 19(4), 561-569
- Bernfeld, P. (1955) **Methods Enzymol.** 1, 149-158.
- Bode, W. & Huber, R. (1992). **Eur. J. Biochem.**, 204, 433-451.
- Chrispeels, M.J., Grossi de Sá, M.F. & Higgins, T.J.V. (1998). **Seed Science Research**, 8, 257-263.
- De Carvalho, P.G.B., Bloch Jr., C., Morly, L., da Silva, M.C.M., Mello, L.V. & Neshich, G. (1996). **Journal of Protein Chemistry**, Vol. 15, 6, 591-598.
- Da Silva, M.C.M., Grossi de Sá, M.F., Chrispeels, M.J., Togawa, R.C. & Neshich, G. (1999). **Protein Enginerring**, aceito.
- Erlich, P.R. & Raven, P.H. (1964).. **Evolution**, 18.
- Feng, G.H., Richardson, M., Chen, M.S., Kramer, K.J., Morgan, T.D. & Reeck, G.R. (1996). **Insect Biochem. Molec. Biol.**, 26(5), 419-426.
- Franco, O.L., Rigden, D.J., Melo, F.R., Bloch Jr., C., Silva, C.P & Grossi de Sá, M.F. (1999) . **Plant Mol. Biol.**, submetido.
- Gatehouse, A.M.R., Boulter D. & Hilder, V.A. (1992). **Biotechnology in Agriculture N° 7: Plant Genetic Manipulation for Crop Protection, CAB International**, 155-181.
- Gatehouse, A. M. R. & Gatehouse, J. A. (1998). **Pestic. Sci.** 52, 165-175.
- Grossi de Sá, M.F., Mirkov, T.E., Ishimoto, M., Colucci, G., Bateman, K.S. & Chrispeels, M.J. (1997). **Planta**, 203: 295-303.
- Grossi de Sá, M.F. & Chrispeels, M.J. (1997). **Insect Biochem. Molec. Biol.**, 27(4), 271-281.
- Grutter, M.G., Priestle, J.P., Rahuel, J., Grossenbacher, H., Bode, W., Hofsteenge, J. & Stone, S. R. (1990). **EMBO J** 9, 2361-2365.
- Hilder, V., Gatehouse, A., Sheerman, S., Barker, R. & Boulter, D. (1987). **Nature**, 330, 160-163.
- Ishimoto, M., Sato, T., Chrispeels, M.J. & Kitamura, K. (1996). **Entomol. Exp. Appl.**, 79, 309-315.
- Kasahara, K., Hayashi, K., Arakawa, T. Philo, J.S., Wen, J.Hara, S. & Yamaguchi, H. (1996) **J. Biochem.**, 120, 177-183.
- La Jolo, F.M., Finardi-Filho, F. & Mezezes, E.W. (1991). **Food Technology**, September, 119-121.
- Neurath, H. (1996). The Diversity of Proteolytic Enzymes. In: Beynon, R. J. & Bond, J. S. (ed.), **Proteolytic Enzymes: A Practical Approach**. New York, Oxford University Press, 1, 1-14.
- Pusztai, A., Grant, G., Duguid, T., Brown, D.S., Peumans, W.J., Van Damme, E.J.M. & Bardocz, S. (1995). **J. Nutr.**, 125, 1554-1562.
- Pusztai A., Bardocz G.G., Alonso R., Chrispeels M.J., Schroeder H.E., Tabe L.M., Higgins, T.J. (1999). **J Nutr**, Aug;129(8):1597-603
- Ryan, C. A. (1990). **Annu. Rev. . Phytopathol.** 28, 425- 449.
- Ryan, S. N., Laing, A. W. & McManus, M. T. (1998). **Phytochemistry**, 49 (4), 957-963.
- Schroeder, H.E., Gollash, S., Moore, A., Tabe, L.M., Craig, S., Hardie, D., Chrispeels, M.J., Spencer, D. & Higgins, T.J.V. (1995). **Plant Physiol.**, 107, 1233-1239.
- Shade, R.E., Schroeder, H.E., Pueyo, J.J., Tabe, L.L., Murdock, T.J.V., Higgins, M.J. & Chrispeels, M.J. (1994). **Bio/Technology**, 12, 793-796.
- Walker, A. J., Ford, L., Majerus, M. E. N., Geoghegan, a. e., Birch, N., Gatehouse, J. A. & Gatehouse, A. M. R. (1997). **Insect Biochem. And Mol. Biol**, 28, 173-180.
- Xavier-Filho, J. (1992). **R. Bras. Fisiol. Veg.** 4(1):1-6.