

I WORKSHOP DE INTERAÇÃO MOLECULAR PLANTA-PRAGAS



13 e 14 de dezembro de 2004 - AUDITÓRIO CENTRAL
EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA
Coordenação: Dr^a Maria Fátima Grossi de Sá
Brasília - DF

República Federativa do Brasil

Luiz Inácio Lula da Silva

Presidente

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Roberto Rodrigues

Ministro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Conselho de Administração

José Amauri Dimárzio

Presidente

Clayton Campanhola

Vice-Presidente

Alexandre Kalil Pires

Dietrich Gerhard Quast

Sérgio Fausto

Urbano Campos Ribeiro

Membros

Diretoria-Executiva da Embrapa

Clayton Campanhola

Diretor-Presidente

Gustavo Kauark Chianca

Herbert Cavalcante de Lima

Mariza Marilena T. Luz Barbosa

Diretores-Executivos

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

José Manuel Cabral de Souza Dias

Chefe -Geral

Maurício Antônio Lopes

Chefe-Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Maria Isabel de Oliveira Penteado

Chefe-Adjunto de Comunicação e Negócios

Maria do Rosário de Moraes

Chefe-Adjunto de Administração

Documentos 123

I WORKSHOP DE INTERAÇÃO MOLECULAR PLANTA-PRAGAS

Programa e Resumos Expandidos

COMISSÃO ORGANIZADORA:

Maria Fátima Grossi de Sá (Coordenação Geral)
Maria Cristina Mattar da Silva (Vice-coordenação)
Edson Luiz Zangrando Figueira
Francine Barbosa Silva
Marília Santos Silva
Norma Santos Paes
Osmundo Brilhante de Oliveira Neto

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa - Recursos Genéticos e Biotecnologia

Serviço de Atendimento ao Cidadão
Parque Estação Biológica, Av. W5 Norte (Final) - Brasília, DF
CEP 70770-900 - Caixa Postal 02372
PABX: (61) 448-4600
Fax: (61) 340-3624
<http://www.cenargen.embrapa.br>
e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Maria Isabel de Oliveira Penteado
Secretária-Executiva: Maria da Graça Simões Pires Negrão
Membros: Arthur da Silva Mariante
Maria Alice Bianchi
Maria da Graça S. P. Negrão
Maria de Fátima Batista
Maria Isabel de O. Penteado
Maurício Machain Franco
Regina Maria Dechechi Carneiro
Sueli Correa Marques de Mello
Vera Tavares de Campos Carneiro

Supervisor Editorial: Maria da Graça Simões Pires Negrão
Normalização Bibliográfica: Maria Alice Bianchi
Tratamento de Ilustrações e capa: Altevir de Carvalho Freitas
Editoração Eletrônica: Altevir de Carvalho Freitas

2ª edição

1ª impressão (2004): tiragem

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

W 926 Workshop de Interação Molecular Planta-Pragas (1. : 2004 : Brasília, DF).
Programa e resumos expandidos : I Workshop de Interação Molecular
Planta-Pragas, 2004. – Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e
Biotecnologia, 2004.
190 p. – (Documentos / Embrapa Recursos Genéticos e
Biotecnologia, 0102-0110; 123)

1. Laboratório de Interação Molecular Planta-Pragas - Embrapa Recursos
Genéticos e Biotecnologia. 2. Laboratório de Interação Molecular Planta-Pragas
– projetos de pesquisa. I. Título. II. Série.

632 – CDD 21

**I WORKSHOP DE INTERAÇÃO MOLECULAR PLANTA-PRAGAS
EMBRAPA – 2004**

COMISSÃO ORGANIZADORA

Maria Fátima Grossi de Sá (Coordenação Geral)
Maria Cristina Mattar da Silva (Vice-coordenação)
Edson Luiz Zangrando Figueira
Francine Barbosa Silva
Marília Santos Silva
Norma Santos Paes
Osmundo Brilhante de Oliveira Neto

Capa: Liziane Maria de Lima

**EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA
BRASÍLIA, DF - 2004**

APRESENTAÇÃO

O I Workshop de Interação Molecular Planta-Pragas é um evento promovido pelos membros do Laboratório de Interação Molecular Planta-Pragas, localizado na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, sob a coordenação da pesquisadora Maria Fátima Grossi-de-Sá.

A realização do evento, aberto a comunidade científica em geral, tem como objetivo específico à apresentação dos projetos de pesquisa em desenvolvimento no Laboratório, proporcionando a interação da equipe (pesquisadores, estudantes de graduação e pós-graduação) e convidados especiais (parcerias) através da discussão de resultados experimentais, levantamento de perspectivas e estabelecimentos de novas parcerias.

Os resultados dos dois principais projetos do Laboratório: Estratégias moleculares aplicadas à prospecção de genes visando o controle de insetos-praga e Estratégias moleculares aplicadas à prospecção de genes envolvidos com resistência de plantas ao parasitismo de fitonematóides estão organizados na forma de 31 resumos expandidos, apresentados oralmente pelos responsáveis, de forma a estimular a realização de debates.

Este evento também marca o momento da divulgação da homepage do Laboratório (<http://www.cenargen.embrapa.br/laboratorios/LIMPP>) onde podem ser encontradas informações detalhadas sobre a composição da equipe e as linhas de pesquisa em desenvolvimento.

Finalmente, gostaríamos de parabenizar e agradecer todos os participantes deste Workshop. Em especial, agradecer a comissão organizadora pelo trabalho realizado e a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, a Universidade de Brasília, a Universidade Católica de Brasília, a Universidade Federal do Rio Grande do Sul, a CAPES, ao CNPq, a FACUAL e FIALGO pelo apoio recebido.

PROGRAMA

I WORKSHOP DE INTERAÇÃO PLANTA- PRAGAS

13 e 14 de Dezembro de 2004

Auditório Central

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Segunda-feira, 13 de Dezembro de 2004

8:30-9:00 Abertura

9:00 – 9:30 – Projetos desenvolvidos no Laboratório de Interação Molecular Planta-Pragas.
Dr. Maria Fátima Grossi de Sá – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

SESSÃO I - INIBIDORES DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS E SUAS APLICAÇÕES NO CONTROLE DE PRAGAS

Coordenador: *Maria Fátima Grossi de Sá*

9:30 -10:00 - Evolução molecular *in vitro* de inibidores de α -amilases: Especificidade de interação e aplicação no controle de pragas de importância econômica - **Maria Cristina Mattar da Silva** – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. **Resumo 01**

10:00-10:30 - Inibidores de α -amilases e suas aplicações no controle da broca-do-café (*Hypothenemus hampei*) - **Railene de Azevedo Pereira** - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia/UnB. **Resumo 02**

10:30-10:45 – Intervalo

10:45-11:15 - Inibidores de α -amilases e seu potencial no controle do bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis*) - **Simoni Campos Dias** - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia/UnB. **Resumo 03**

11:15-11:45 - Purificação e caracterização de três diferentes inibidores de α -amilase extraídos de sementes de baru (*D. alata*), com atividade contra enzimas digestivas de insetos-praga - **Octávio Luiz Franco** - Universidade Católica de Brasília. **Resumo 05**

11:45-12:15 - Clonagem, expressão e purificação de uma proteinase serínica ativa de *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera:Bruchidae) em *E. coli* - **Cláudio Picanço Magalhães** - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. **Resumo 04**

SESSÃO II - PROTEÍNAS ENTOMOTÓXICAS APLICADAS NO CONTROLE DE PRAGAS

Coordenador: *Maria Cristina Mattar da Silva*

14:00-14:30 - Laboratório de Biologia Molecular de Insetos da Embrapa Algodão - **Wagner Lucena** - Embrapa-Algodão. **Resumo 10**

14:30-15:00 – Isolamento de genes de *Bacillus thuringiensis* com potencial uso no controle das pragas do algodoeiro – **Maria Fátima Grossi de Sá** – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. **Resumo 08**

15:00-15:30 - Seleção de toxinas Cry com alta especificidade e toxicidade contra o bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis*) e lagarta do cartucho do milho (*Spodoptera frugiperda*) - **Edson Luiz Z. Figueira** - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. **Resumo 09**

15:30-16:00 - Clonagem do gene *cry8Ga* de *Bacillus thuringiensis* e construção de um gene sintético para expressão em plantas de algodão - **João Aguiar Nogueira Batista** Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. **Resumo 11**

16:00-16:20 – Intervalo

16:20-16:50 - Caracterização do gene da Cholesterol Oxidase com vista ao controle do bico do algodão via transgenia - **Eugen Gander** - *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*. **Resumo 07**

16:50-17:20 - Jaburetox-2ec: peptídeo recombinante derivado de urease de *Canavalia ensiformis* com atividade bioinseticida - **Fernanda Mulinari** - *Universidade Federal do Rio Grande de Sul/Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*. **Resumo 13**

Terça-feira, 14 de Dezembro de 2004

SESSÃO III - ESTRATÉGIAS MOLECULARES VISANDO O CONTROLE DE NEMATÓIDES

Coordenador: Osmundo Brilhante de Oliveira Neto

8:00-8:30 - Caracterização funcional de promotores do gene da proteína de conjugação a ubiquitina da família leubc4 de soja e algodão - **Antônio Américo B. Viana** - *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*. **Resumo 16**

8:30-9:00 - Genômica funcional aplicada no controle de parasitismo do nematóide formador de galhas *Meloidogyne incognita* - **Rodrigo da Rocha Fragoso** - *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia/UnB*. **Resumo 18**

9:00-9:30 - Seleção de anticorpos específicos a proteínas de secreção do nematóide de galha de raiz (*Meloidogyne incognita*) - **Liziane Maria Lima** - *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia/UnB*. **Resumo 22**

9:30-10:00 - Isolamento e caracterização de cDNAs de proteinases serínica e aspártica do nematóide formador de galhas *Meloidogyne incognita* - **Rodrigo da Rocha Fragoso** - *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia/UnB*. **Resumo 17**

10:00-10:20 - Intervalo

10:20-10:50 - Utilização de propeptídeos como fatores de inibição de proteinases de fitonematóides - **Francine Barbosa Silva** – *Universidade Católica de Brasília*. **Resumo 19**

10:50-11:20 - O propeptídeo de cisteína-proteinase influencia o desenvolvimento do nematóide de cisto da soja, *Heterodera glycines* - **Brener B. Marra** - *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia/Unb*. **Resumo 21**

11:20-11:50 - Expressão diferencial de proteínas de *Coffea canephora* infectados com o nematóide endoparasita *Meloidogyne* spp - **Ângela Mehta** - *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*. **Resumo 23**

11:50-12:20 - Efeitos de extratos de sementes de plantas antagonistas sobre a mortalidade de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita* - **Thales Lima Rocha** - *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*. **Resumo 24**

SESSÃO IV - TRANSFORMAÇÃO DE PLANTAS COM GENES DE CONTROLE A PRAGAS

Coordenador: Edson Luiz Zangrando Figueira

14:30-15:00 - Aplicação das técnicas de cultivo de tecidos na transformação genética do algodoeiro - **Márcia S. Vidal** - *Embrapa Algodão*. **Resumo 26**

15:00-15:30 - Transformação de plantas de algodoeiro via tubo polínico visando o controle do bico-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis*) - **Osmundo Brilhante de Oliveira Neto** - *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*. **Resumo 27**

15:30-15:50 - Intervalo

15:50- 16:20 - Estudos da regeneração de plantas de algodão via embriogênese somática - **Norma Santos Paes** - *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*. **Resumo 28**

16:20-16:50 - Obtenção de plantas *Coffea arabica* geneticamente modificadas com gene para inibição da broca - **Érika V. S. Barros** - *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*.

Resumo 29

16:50 - Encerramento.

Sessão 1: Inibidores de enzimas hidrolíticas e suas aplicações no controle de pragas

- 01-** EVOLUÇÃO MOLECULAR *IN VITRO* DE INIBIDORES DE α -AMILASES: ESPECIFICIDADE DE INTERAÇÃO E APLICAÇÃO NO CONTROLE DE PRAGAS DE IMPORTÂNCIA ECONÔMICA. - Silva, M.C.M.; Teixeira, F.R.; Del Sarto, R.P.; Figueira, E.L.Z.; Maranhão, A.Q.; Brígido, M.M.; Chrispeels, J.M. e Grossi de Sá, M.F 017
- 02-** INIBIDORES DE α -AMILASES E SUAS APLICAÇÕES NO CONTROLE DA BROCA-DO-CAFÉ (*Hypothenemus hampei*). – Pereira, A.P.; Batista, J.A.N.; Oliveira Neto, O.B.; Silva, M.C.M.; Berçot, M.A.; Figueira, E.L.Z.; Valencia, A. e Grossi de Sá, M.F023
- 03-** INIBIDORES DE α -AMILASES E SEU POTENCIAL NO CONTROLE DO BICUDO DO ALGODOEIRO (*Anthonomus grandis*). – Dias, S.C.; Franco, O.L.; Silva, M.C.M.; Magalhães, C.P.; Oliveira Neto, O.B.; Laumann, R.A.; Figueira, E.L.Z. e Grossi de Sá, M.F.....029
- 04-** CLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE UMA PROTEINASE SERÍNICAATIVA DE *Zabrotes subfasciatus* (COLEOPTERA: BRUCHIDAE) EM *E. coli*. - Magalhães, C.P.; Souza, D.S.L.; Fragoso, R.R.; Franco, O.L. e Grossi de Sá, M.F.....033
- 05-** PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE TRES DIFERENTES INIBIDORES DE α -AMILASES EXTRAÍDOS DE SEMENTES DE BARU (*D. alata*), COM ATIVIDADE CONTRA ENZIMAS DIGESTIVAS DE INSETOS-PRAGA. – Bonavides, K.B.; Pelegrini, P.B; Noronha, E.F.; Grossi de Sá, M.F.; Boch Jr., C. e Franco, O.L.....037
- 06-** ESTRATÉGIA MOLECULAR PARA RESISTÊNCIA A PRAGAS DE GRÃOS DE CEREIAS: CLONAGEM E EXPRESSÃO DA α -AMILASES DE *Rhyzopertha dominica*. - Mello, L.V.; Batista, J.A.N.; Redondo, A.C.C.; Sousa, L.M.P.; Castro, F.C.; Findlay, J.B.C. e Grossi de Sá, M.F.....043

SESSÃO 2: Proteínas entomotóxicas aplicadas no controle de pragas

- 07-** CARACTERIZAÇÃO DO GENE DA CHOLESTEROL OXIDASE COM VISTA AO CONTROLE DO BICUDO DO ALGODÃO VIA TRANSGENIA. - Santos, R. C.; Marcelino, L. H. e Gander, E. S.....049
- 08 –** ISOLAMENTO DE GENES DE *Bacillus thuringiensis* COM POTENCIAL USO NO CONTROLE DAS PRAGAS DO ALGODOEIRO. Magalhães, M.T.Q.; Batista, J.A.N.; Fragoso, R.R.; Silva, S.M.B.; Oliveira Neto, O.B.; Oliveira, G.R.; Figueira, E.L.Z.; Monnerat, R.G.; Ayub, M.A.Z.; Soares, L.H.B.; Carlini, C.R.R.S. e Grossi de Sá, M.F.....057
- 09-** SELEÇÃO DE TOXINAS CRY COM ALTA ESPECIFICIDADE E TOXICIDADE CONTRA O BICUDO DO ALGODOEIRO (*Anthonomus grandis*) E LAGARTA DO CARTUCHO DO MILHO (*Spodoptera frugiperda*). – Figueira, E.L.Z.; Brunetta, P.S.F.; Oliveira, G.R.; Cavalcanti, K.L.; Silva, M.C.M. e Grossi de Sá, M.F.....063
- 10-** LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR DE INSETOS - EMBRAPA ALGODÃO. – Lucena, W.; Vidal, M.; Miranda, J.; Belo, A.; Cesário, J.; Fabrício, W.; Dijair, J.; Dantas, M.; Azevedo, I; Patrícia, K.; Sousa, C.; Silva, P. e Lyra, J.....069

11- CLONAGEM DO GENE <i>cry8Ga</i> DE <i>Bacillus thuringiensis</i> E CONSTRUÇÃO DE UM GENE SINTÉTICO PARA EXPRESSÃO EM PLANTAS DE ALGODÃO. - Batista, J.A.N.; Magalhães, M.T.Q. e Grossi de Sá, M.F.....	073
12- CryDATA – A STRUCTURAL DATABASE FOR DELTA ENDOTOXIN FROM <i>Bacillus thuringiensis</i> . – Fonseca, G.L.S.; Ramirez, M.D.M.; Porto, D.P.; Vilela, F.B.; Solon, A.; Togawa, R.C.; Costa, M.M. e Martins, N.F.....	081
13- JABURETOX-2EC: PEPTÍDEO RECOMBINANTE DERIVADO DE UREASE DE <i>Canavalia ensiformis</i> COM ATIVIDADE BIOINSETICIDA. - Mulinari, F.; Stanisçuaski, F.; Carlini, C.R; Grossi de Sá, M. F.....	089
14- PEPTÍDEOS DE SEMENTES DE MARACUJÁ (<i>Passiflora edulis</i>): UMA NOVA ESTRATÉGIA NO CONTROLE DE FUNGOS FILAMENTOSOS. - Pelegrini, P.B.; Moreira, I.C.; Bloch Jr., C.; Noronha, E.F. e Franco, O.L.....	093
SESSÃO 3: Estratégias moleculares visando o controle de nematóides	
15- BUSCA DE GENES DE RESISTÊNCIA EM <i>Arachis</i> SILVESTRE. – Guimarães, P.M.; Leal-Bertioli, S.; Fávero, A; Valls, J.F.M.; Morethzohn, M., Bertioli, D.....	097
16- CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE PROMOTORES DO GENE DA PROTEÍNA DE CONJUGAÇÃO A UBIQUITINA DA FAMÍLIA LEUBC4 DE SOJA E ALGODÃO. - Guimarães, L.M., Viana, A.A.B., Batista, J.A.N. e Grossi de Sá, M.F.....	103
17- ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE cDNAs DE PROTEINASES SERÍNICA E ASPÁRTICA DO NEMATÓIDE FORMADOR DE GALHAS <i>Meloidogyne incógnita</i> . – Fragoso, R.R.; Batista, J.A.N.; Oliveira Neto, O.B.; Dusi, D.A. e Grossi de Sá, M.F.	109
18- GENÔMICA FUNCIONAL APLICADA NO CONTROLE DE PARASITISMO DO NEMATÓIDE FORMADOR DE GALHAS <i>Meloidogyne incógnita</i> . - Viana, A.A.B.; Fragoso, R.R.; Guimarães, L.M.; Paes, N.S.; Batista, J.A.N.; Brígido, M.M. e Grossi de Sá, M.F.....	115
19- UTILIZAÇÃO DE PROPEPTÍDEOS COMO FATORES DE INIBIÇÃO DE PROTEINASES DE FITONEMATÓIDES. – Silva, F.B.; Batista, J.A.N.; Del Sarto, R.P.; Marra, B.M.; Grossi de Sá, M.F.....	119
20- ANÁLISE FUNCIONAL DE GENES COM POTENCIAL ENVOLVIMENTO NO PARASITISMO DO FITONEMATÓIDE <i>Meloidogyne incognita</i> (Kofoid & White, 1919) RAÇA III. - Souza, D.S.L.; Romano, E.; Martins de Sá, C.; Fragoso, R.R.; Marra, B. M.; Grossi de Sá, M.F.....	125
21- O PROPEPTÍDEO DE CISTEÍNA-PROTEINASE INFLUENCIA O DESENVOLVIMENTO DO NEMATÓIDE DE CISTO DA SOJA, <i>Heterodera glycines</i> . – Marra, B.M.; Batista, J.A.N.; Silva, F.B.; Del Sarto, R.P.; Figueira, E.L.Z.; Souza, D.S.L.; Sá, C.M. e Grossi de Sá, M.F.....	131
22- SELEÇÃO DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS A PROTEÍNAS DE SECREÇÃO DO NEMATÓIDE DE GALHA DE RAIZ (<i>Meloidogyne incognita</i>). – Lima, L.M.; Guimarães, L.M.; Vieira, P.M.M.M.; Carneiro, R.M.D.G.; Batista, J.A.N.; Silva, M.S.; Maranhão, A.Q.; Brígido, M.M. e Grossi de Sá, M.F.....	137

23- EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS DE *Coffea canephora* INFECTADOS COM O NEMATÓIDE ENDOPARASITA *Meloidogyne spp.* – Mehta, A., Andrade, A.E., Albuquerque, E.V.S., Carneiro, R.M.D.G., Carneiro, R.G. e Grossi de Sá, M. F.....141

24- EFEITOS DE EXTRATOS DE SEMENTES DE PLANTAS ANTAGONISTAS SOBRE A MORTALIDADE DE JUVENIS DE SEGUNDO ESTÁDIO DE *Meloidogyne incognita*. - Almeida, C.D.S.; Magalhães, J.C.C.; Franco, P.; Salomão, D.; Randig, O.; Carneiro, R.M.D.G.; Grossi de Sá, M.F.; Rocha, T.L.....145

25- INVESTIGAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS EXISTENTES NO EXTRATO AQUOSO DE SEMENTES DE *Canavalia ensiformes* (FEIJÃO-DE-PORCO) COM EFEITO NEMATICIDA A JUVENIS DE SEGUNDO ESTÁDIO DE *Meloidogyne incognita* RAÇA 3. - Evaristo, R.G.S.; Magalhães, J.C.C.; Franco, P.; Randig, O.; Carneiro, R.M.D.G.; Souza, D.S.L.; Grossi de Sá, M.F. e Rocha, T.L.....149

SESSÃO 4: Transformação de plantas com genes de controle a pragas

26- APLICAÇÃO DAS TÉCNICAS DE CULTIVO DE TECIDOS NA TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DO ALGODOEIRO. - Vidal, M.S.; Carvalho, J.M.F.; Santos, J.W.; Lima, L.H.G.M.; Sousa, E.B.M.; Sousa, D.M.M.....155

27- TRANSFORMAÇÃO DE PLANTAS DE ALGODOEIRO VIA TUBO POLÍNICO VISANDO O CONTROLE DO BICUDO-DO-ALGODOEIRO, *Anthonomus grandis*. - Oliveira Neto, O.B.; Batista, J.A.N.; Evangelista, I.B.R.; Viana, A.A.B.; Cavalcante, K.L.; Craveiro, K.I.C. e Grossi de Sá, M.F.....159

28- ESTUDOS DA REGENERAÇÃO E TRANSFORMAÇÃO DE PLANTAS DE ALGODÃO VIA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA. – Paes, N.S.; de Lacerda, H.M.; Borba, T.C.B.; Bueno, I.B.E.; Cavalcanti, K.L.; Craveiro, K.I.C.; Cabral, G.B. e Grossi de Sá, M.F.....165

29- OBTENÇÃO DE PLANTAS *Coffea arabica* GENETICAMENTE MODIFICADAS COM GENE PARA INIBIÇÃO DA BROCA. - Machado, F.R.B.; Berçot, M.A.; Dayler, C.; Palácio, T.C.; Vianna, G.R.; Paes, N. S.; Pereira, A.R.; Grossi de Sá, M.F. e Barros, E.V.S.A.171

30- REGENERAÇÃO DE PLANTAS DE FEIJÃO AZUKI (*Vigna angularis*) VIA ORGANOGÊNESE DIRETA. - Coutinho, M.V.; Costa, M.F.; Silva, R.O.; Paes, N.S.; Grossi de Sá, M.F.175

31- REGENERAÇÃO DE FEIJÃO DE CORDA [*Vigna unguiculata* (L.) WALP.]: RESULTADOS INICIAIS DE EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA. – Coutinho, M.V.; Silva, R.O.; Costa, M.F.; Paes, N.S. e Grossi de Sá, M.F.181

32 - O QUE FAZ DO GENE *SnOLP* DE *Solanum nigrum* var. *americanum* UM CANDIDATO PARA O CONTROLE DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS?
Campos, M.A.^{1,2}, Ribeiro, S.G.¹, Silva, M.S.¹, Magalhães, C.P.¹, Del Sarto, R.P.¹, Lacorte, C.¹, Rigden, D.J.¹, Monte, D.C.¹ e Grossi-de Sá, M.F.¹.....185

01 - EVOLUÇÃO MOLECULAR *IN VITRO* DE INIBIDORES DE α -AMILASES: ESPECIFICIDADE DE INTERAÇÃO E APLICAÇÃO NO CONTROLE DE PRAGAS DE IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

Silva, M.C.M.^{1,2}; Teixeira, F.R.^{1,2}; Del Sarto, R.P.^{1,2}; Figueira, E.L.Z.¹; Maranhão, A.Q.³; Brígido, M.M.³; Chrispeels, J.M.⁴ e Grossi-de Sá, M.F.¹

¹Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia; ² Faculdade da Terra de Brasília;

³Universidade de Brasília- Dep. de Biologia Celular; ⁴ University of San Diego -Califórnia

RESUMO

As plantas, principalmente leguminosas e cereais, são susceptíveis a ataques de bruquídeos e outros insetos, que são capazes de infestar sementes e outros tecidos vegetais, apesar da presença de compostos de defesa. O botão floral do algodoeiro possui grãos de amido que são alvos do ataque do bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis*), o que explica a alta atividade amilolítica existente no intestino de larvas e insetos adultos. Os inibidores de α -amilases (α Als) ocorrem em muitas plantas como parte do mecanismo de defesa natural e constituem excelentes ferramentas para a construção de plantas geneticamente modificadas resistentes a insetos. As isoformas α AI-1 e α AI-2 presentes em *Phaseolus vulgaris* estão bem caracterizadas e apresentam interessante especificidade em relação a insetos e mamíferos. Os genes que codificam para os inibidores α AI-1 e α AI-2 foram fragmentados e submetidos à recombinação pela técnica de *DNA Shuffling*, gerando uma grande população de mutantes. O produto do *DNA Shuffling*, combinado com a técnica de *Phage Display*, gerou uma biblioteca combinatória contendo 10^7 transformantes expressando mutantes de inibidores de α -amilases na superfície de fagos. Esta biblioteca é útil para selecionar genes inibidores com atividade nova ou potencializada contra pragas de importância para a agricultura. Os resultados apresentados referem-se à seleção de genes mutantes com afinidade para as enzimas ZSA e AGA. A partir de imunoenaios e análises das seqüências primárias de vários clones recombinantes foi possível selecionar 13 genes mutantes apresentando afinidade para ZSA e 23 para AGA. As seqüências obtidas foram submetidas a estudos de estrutura tridimensional e os genes mutantes serão subclonados para expressão de proteínas ativas em quantidade suficiente para realização de bioensaios e estudos de especificidade contra praga de interesse econômico para agricultura.

INTRODUÇÃO

As α -amilases são as enzimas digestivas mais importantes de muitos insetos que se alimentam exclusivamente de produtos da clivagem de amido, durante a fase larval e/ou quando adultos. A ampla caracterização bioquímica, molecular e estrutural desta classe de enzimas (Quian *et al.*, 1993, Grossi-de-Sá e Chrispeels, 1997 e Strobl *et al.*, 1998) isoladas e/ou formando complexos com moléculas inibidoras (Bompard-Gilles *et al.*, 1996; Silva *et al.*, 2000; Franco *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2004) é necessária para o progresso de programas científicos que utilizam compostos endógenos e técnicas de engenharia genética para gerar plantas resistentes a pragas de impacto econômico para a agricultura.

Os inibidores de α -amilases (α Als) são encontrados em abundância em cereais e legumes (revisão de Franco *et al.*, 2002 para referências) e fazem parte de uma família de proteínas de defesa de muitas plantas. Os inibidores tipo lectina, presentes em feijão comum (*P. vulgaris*) tem sido alvo de muitos estudos por apresentarem efeitos tóxicos para vários insetos (Ishimoto e Kitamura, 1989; Huesing *et al.*, 1991; Ishimoto e Chrispeels, 1996; Grossi-de-Sá *et al.*, 1997). As isoformas α AI-1 e α AI-2 presentes em *P. vulgaris* apresentam

interessante especificidade em relação a insetos e mamíferos. O α AI-1 encontrado na maioria das variedades cultivadas inibe α -amilases de mamíferos, tais como, a α -amilase pancreática de porco (PPA) e dos insetos *Callosobruchus chinensis*, *C. maculatus* e *Bruchus pisorium* (caruncho da ervilha), mas não inibe a α -amilase do caruncho do feijão mexicano, *Zabrotes subfasciatus* (ZSA), que representa uma importante praga de armazenamento de feijão comum (Grossi-de-Sá *et al.*, 1997). A outra isoforma, o α AI-2 é encontrado em feijão não domesticado e possui 78% de identidade de aminoácidos com o α AI-1, porém inibe unicamente a ZSA (Ishimoto e Kitamura, 1992, 1993; Suzuki *et al.*, 1993; Grossi-de-Sá e Chrispeels, 1997; Grossi-de-Sá *et al.*, 1997). As análises de mutantes destes inibidores, construídos por técnicas de mutagênese sítio dirigida, (Mirkow *et al.*, 1995; Grossi-de-Sá *et al.*, 1997; Silva *et al.*, 2004) foram importantes para confirmar o envolvimento de certas regiões na interação enzima-inibidor, no entanto, indicaram a necessidade de se determinar outros parâmetros para elucidar a questão de especificidade.

Altos níveis de atividade amilásica foram detectados no intestino de bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis*), no estágio larval e no inseto adulto (Oliveira-Neto *et al.* 2003). Em botões florais jovens do algodoeiro, o estágio mais atacado pelo bicudo para alimentação e oviposição, foi detectado a presença de amido. Também foram observadas grandes quantidades de grãos de amido, principalmente nos grãos de pólen e óvulos. Assim, a utilização de inibidores de α -amilases, efetivos contra o bicudo do algodoeiro, pode ser uma estratégia promissora para o controle deste inseto.

Os avanços da biologia molecular têm possibilitado a aplicação de metodologias que visam dirigir artificialmente a evolução molecular em função de objetivos pré-determinados. Os genes que codificam para os inibidores α AI-1 e α AI-2, foram fragmentados e recombinados pela técnica de *DNA shuffling* (Stemmer *et al.*; Zhao *et al.*, 1997) e uma população diversa de genes mutantes de inibidores de α -amilases foi obtida. O produto do *DNA shuffling* foi clonado em fagomídeo e a construção usada para gerar uma biblioteca combinatória contendo 10^7 variantes de α Als expressando na superfície de fagos (*Phage Display*). Esta biblioteca pode ser usada para a seleção de genes com função inibitória nova ou potencializada em enzimas que participam da via de liberação de carboidratos. Os resultados apresentados aqui se referem à seleção de inibidores mutantes com afinidade para as α -amilases das larvas dos insetos *Z. subfasciatus* (ZSA) e *A. grandis* (AGA). A realização de bioensaios possibilitará indicar genes específicos que codificam para inibidores mutantes potencializados para a atividade contra ZSA e AGA, entre outras pragas. Finalmente, estes genes serão utilizados na obtenção de plantas geneticamente modificadas, visando à resistência ao ataque de bruquídeos e do bicudo do algodoeiro.

MATERIAL E MÉTODOS

DNA shuffling usando os inibidores α AI-1 e α AI-2

Para aplicação de *DNA shuffling* foi adaptado o protocolo de Stemmer (1994) e Zhao e Arnold (1997). Os genes α AI-1 e α AI-2 foram misturados (1:1) e randomicamente fragmentados usando a enzima *DNase I* (1,5 U/mL, 10min, 15°C). Os fragmentos foram recombinados através de vários ciclos de PCR sem adição de oligonucleotídeos. A recombinação ocorreu durante a etapa de extensão, quando novos nucleotídeos são adicionados aos duplexes compostos de fragmentos dos dois genes. Após a adição de oligos específicos e novos ciclos de PCR (contendo a extensão expandida), recuperou-se uma população contendo genes recombinados em tamanho correspondente aos originais.

Biblioteca combinatória de mutantes α Als.

A construção da biblioteca foi baseada no protocolo de Barbas *et al.*, 2001. O produto de recombinação do *shuffling* foi digerido com a enzima *Sfi* I e inserido no fagomídeo pComb3X (Figure 2). Esta construção serviu para transformar células de *E. coli* XL-1 Blue usadas para infectar fagos que passaram a expressar os mutantes em sua superfície.

Uso da biblioteca para a seleção de genes mutantes de α Als com afinidade para as α -amilases dos insetos.

O protocolo para seleção de fagos específicos foi adaptado de Barbas *et al.*, 2001. Utilizou-se 20 μ g/poço de extrato protéico do intestino das larvas dos insetos *Z. subfasciatus* e de *A. grandis*. Os fagos específicos foram eluídos com tampão ácido (0.1M glicine-HCl pH 2.2) e imediatamente neutralizados com solução Tris-base 2M. O enriquecimento de fagos específicos foi monitorado através de titulação de colônias.

Ao término de cinco ciclos de seleção para as ZSA e AGA a população de fagos recuperados de cada ciclo foi submetida ao teste “Fago-Elisa” (Barbas *et al.*, 2001) para acompanhamento do sucesso do experimento.

Indução das proteínas recombinantes

O precipitado de bactéria dos ciclos escolhidos a partir dos dados de contagem de colônias e de teste de Elisa foi utilizado para preparação de DNA plasmidial. Este material, representando um “pool” de clones de mutantes de α Als foi usado para transformação de células de *E. coli* TOP10 F'. As colônias isoladas foram testadas por PCR para verificar a integridade dos genes e então, 96 clones foram submetidos à indução da proteína usando 1 mM de IPTG. Os sobrenadantes dos cultivos de indução (5 μ l/clone) foram aplicados em imuno-dots usando anticorpo anti-hemaglutinina para identificar clones expressando proteínas recombinantes.

Análises de sequências

Os clones expressando proteínas recombinantes foram usados para transformação de bactéria XL-1 Blue e a preparação de DNA foi submetida ao sequenciamento automático. O programa ClustalW foi aplicado para obter o alinhamento das sequências. Os estudos comparativos com as sequências originais dos α AI-1 e α AI-2 permitiram identificar o tipo de recombinação ocorrida em cada clone.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os fragmentos resultantes da digestão da mistura dos genes α AI-1 and α AI-2 usando *DNase* I e a população de recombinantes (banda de 660pb) aplicada na construção da biblioteca de fagos está mostrada na figura 1.

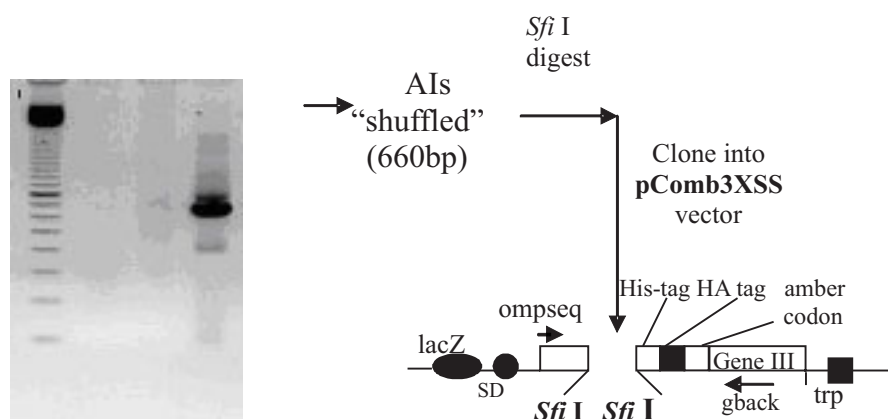


Figura 1. Gel de agarose (2%) mostrando resultado do *DNA shuffling* para os genes α AI-1 and α AI-2. Colunas: 1, marcador 100bp; 2, mistura 1:1 de α AIs (10 μ g total) após 10 min de digestão com *DNase I*; 3, Início da etapa de recombinação dos fragmentos digeridos, usando PCR sem adição de oligos e 4, produto de PCR com adição de oligos específicos mostrando o produto de recombinação no tamanho correspondente ao genes originais. O esquema ilustra o vetor construído para obtenção da biblioteca.

A biblioteca contendo $3,4 \times 10^7$ colônias (cfu/ml) por 2ml foi utilizada para identificar mutantes de aAIs apresentando afinidade para ZSA e AGA. O DNA do segundo e quinto ciclos da seleção contra ZSA e do segundo ciclo da seleção contra AGA foram usados para transformação de bactérias. Os resultados dos *imunodots* (figura 2) mostraram a expressão de 38 e 36 clones da seleção contra ZSA e AGA, respectivamente. Estes clones foram analisados por PCR e aqueles que apresentaram a banda de 660pb (tamanho original do gene) foram usados para transformar bactéria XL-1Blue. Suas seqüências primárias foram obtidas por seqüenciamento automático. As análises das seqüências dos clones recombinantes, em comparação com as seqüências dos genes α AI-1 e α AI-2 originais, mostraram 13 mutantes da seleção contra ZSA e 23 mutantes da seleção para AGA (figura 3) apresentando diferentes padrões de recombinação.

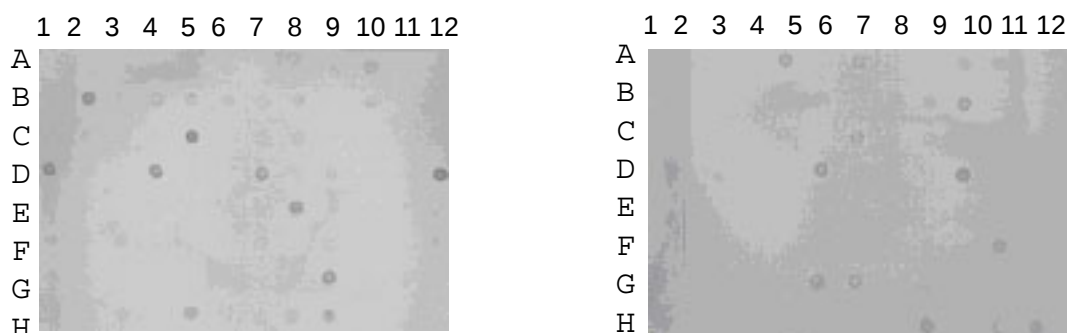


Figura 2A: *Imunodots* usando anticorpo anti-HA dos clones que apresentaram afinidade por ZSA. Colunas de 1 a 6 referem-se a transformantes do segundo ciclo e colunas de 7 a 12 referem-se a transformantes do quinto ciclo da seleção. Posições 5H e 6H (foto da esquerda) representam controles positivos e negativos, respectivamente.



Figura 2B: *Imunodots* usando anticorpo anti-HA dos clones que apresentaram afinidade por AGA. Posições H9 e H12 representam controles negativos e positivos, respectivamente.

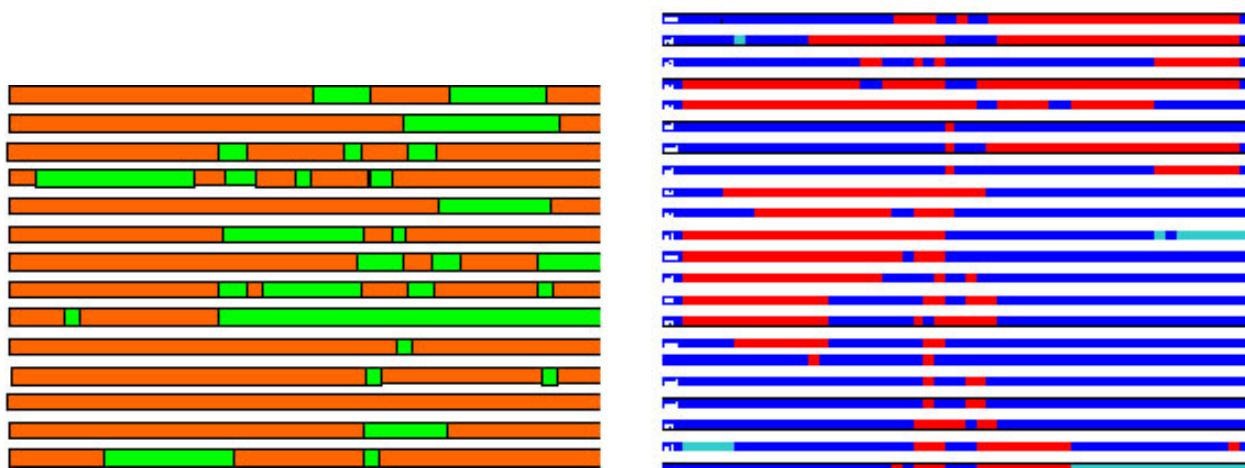


Figura 3: Ilustração mostrando o perfil de recombinação dos mutantes obtidos da seleção contra ZSA (à esquerda) e AGA (à direita). Os retângulos em laranja e azul representam seqüências do α AI-1 e os retângulos em verde e vermelho referem-se à seqüências do α AI-2.

PERSPECTIVAS

Os resultados permitem a validação da estratégia de utilização da biblioteca combinatória para a seleção de mutantes mostrando afinidade por α -amilases específicas.

Os genes mutantes selecionados serão inseridos em vetor de expressão em planta para a produção de proteínas recombinantes ativas em quantidade para realização de testes de atividade *in vitro* e *in vivo*, visando identificar genes mais ativos e específicos contra pragas de impacto econômico para agricultura. Os genes novos ou melhorados serão então, utilizados na obtenção de plantas resistentes a insetos-alvo, que é um dos principais objetivos do grupo de interação molecular planta-pragas da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Em paralelo, as seqüências recombinantes obtidas da seleção serão estudadas por técnicas de modelagem molecular para a identificação de aminoácidos essenciais envolvidos na interação com enzimas específicas. Os resultados serão importantes para elucidação de mecanismos envolvendo especificidade e para o desenho de inibidores específicos para determinada praga.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARBAS III, C.F.; BURTON, D.R.; SCOTT, J.K.; SILVERMAN, G.J. **Phage Display** – A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor laboratory Press, 2001
- BOMPARD-GILLES, C.; ROUSSEAU, P.; ROUGÉ, P.; PAYAN, F. Substrate mimicry in the active centre of a mammalian α -amylase: structural analysis of an enzyme inhibitor complex. **Structure**, v. 4, p. 1441-1452, 1996.
- FRANCO, O. L.; RIDGEN, D. J.; MELO, F. R.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Plant α -amylase inhibitors and their interaction with insect α -amylases. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, n. 2, p. 397-412, 2002.
- GROSSI-DE-SÁ, M. F.; MIRKOV, T.E.; ISHIMOTO, M.; COLUCCI, G.; BATEMAN, K.S.; CHRISPEELS, M. J. Molecular characterization of a bean α -amylase inhibitor that inhibits the α -amylase of the Mexican bean weevil *Zabrotes subfasciatus*. **Planta**, v. 203, p. 295-303, 1997.

GROSSI-DE-SÁ, M.F.; CHRISPEELS, M.J. Molecular cloning of bruchid (*Zabrotes subfasciatus*) α -amylase cDNA and interactions of the expressed enzyme with bean amylase inhibitors. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 27, n. 4, p. 271- 281, 1997.

HUESING, J.E., SHADE, R.E., CHRISPEELS, J.M.; MURDOCK, L.L. α -amylase inhibitor, not phytohemagglutinin explains the resistance of common bean seeds to cowpea weevil. **Plant Physiology**, v. 96, p. 993-996, 1991.

ISHIMOTO, M.; KITAMURA, K. Growth inhibitory effects of an α -amylase inhibitor from kidney bean, *Phaseolus vulgaris* (L.) on three species of bruchids (Coleoptera: Bruchidae) **Applied Entomology and Zoology**, v. 24, n.3, p. 281-286, 1989.

ISHIMOTO, M.; CHRISPEELS, M. J. Protective mechanism of the Mexican bean weevil against high levels of α -amylase inhibitor in the common bean. **Plant Physiology**, v. 111, p. 393-401, 1996.

OLIVEIRA-NETO, O.B.; BATISTA, J.A.N.; RIGDEN, D. J.; FRANCO, O. L.; FALCÃO, R.; FRAGOSO, R.R.; MELLO, L. V.; SANTOS, R.C. DOS; GROSSI-DE-SÁ. Molecular Cloning of α -Amylases from Cotton Boll Weevil, *Anthonomus grandis* and Structural Relations to Plant Inhibitors: An Approach to Insect Resistance, **Journal of Protein Chemistry**, vol. 22, n.1, p. 77-87, 2003.

SILVA, M. C. M. da; GROSSI-DE-SÁ, M. F.; CHRISPEELS, M. J.; TOGAWA, R. C., NESHICH, G. Analysis of structural and physico-chemical parameters involved in the specificity of binding between α -amylase and their inhibitors. **Protein Engineering**, v.13, n. 3, p. 167-177, 2000.

SILVA, M.C.M.DA; MELLO, L.V. ; COUTINHO, M. V.; RIGDEN, D. J.; NESHICH, G.; CHRISPEELS, M. J. AND GROSSI-DE-SÁ, M. F. Mutants of common bean α -amylase inhibitor-2 as approach to investigate the binding specificity to α -amylases. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, n. 3, p. 201-208, 2004.

STEMMER, W. P. C. DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: *in vitro* recombination for molecular evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, p. 10747-10751, 1994.

STROBL, S.; MASKOS, K.; BETZ, M.; WIEGAND, G.; HUBER, R.; GOMIS-RÜTH, F.X.; GLOCKSHUBER, R. Crystal structure of yellow mealworm α -amylase at 1.64 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, v. 278, p. 617-628, 1998.

SUZUKI, K.; ISHIMOTO, M.; KIKUCHI, F.; KITAMURA, K. Growth inhibitory effect of an α -amylase inhibitor from wild common bean resistant of the Mexican bean weevil (*Zabrotes subfasciatus*). **Japanese Journal Breeding**, v. 43, p. 257-265, 1993.

ZHAO, H.; ARNOLD, F. H. Optimization of DNA shuffling for high fidelity recombination. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 1307-1308, 1997.

02 - INIBIDORES DE α -AMILASE E SUAS APLICAÇÕES NO CONTROLE DA BROCA-DO-CAFÉ (*Hypothenemus hampei*)

Pereira, R.A.^{1,2}; Batista, J.A.N.¹; Oliveira Neto, O.B.¹; Silva, M.C.M.¹; Berçot, M.A.^{1,2}; Figueira, E.L.Z.¹; Valencia, A³ e Grossi de Sá, M.F.¹

¹Embrapa – Recursos Genéticos e Biotecnologia; ²Departamento de Biologia Celular – Universidade de Brasília; ³Departamento de Química – Universidade de Caldas, Calle, Colombia.

RESUMO

Brasil é o principal produtor e exportador de café do mundo. Das espécies cultivadas, *Coffea arabica* e *Coffea canephora* (robusta) são as mais importantes economicamente, sendo *C. arabica* responsável por 70% da produção mundial, enquanto que o *C. canephora* é responsável por apenas 25%. No Brasil 85% do café exportado é do tipo arábica, sendo considerado um café de alta qualidade. Apenas em regiões restritas cultiva-se o café robusta, utilizado na produção de café solúvel. A broca-do-café é a principal praga do cafeeiro no Brasil, alcançando dimensões epidêmicas que afetam a quantidade e a qualidade dos grãos. Considerável atenção tem sido dada aos problemas causados pela broca-do-café e pesquisas vêm sendo conduzidas baseadas nos mecanismos envolvidos na resistência de plantas ao ataque do inseto-praga, em particular, no uso de compostos anti-metabólicos, tais como os inibidores de enzimas hidrolíticas digestivas, amilases e proteinases, os quais possuem um enorme potencial para serem incluídos dentro do programa de melhoramento genético através da biotecnologia. Estudos recentes mostraram que um inibidor de α -amilase, presente em acesso selvagem de *Phaseolus coccineus* inibiu totalmente a atividade da α -amilase digestiva da broca-do-café. Baseado nesse dado e visando desenvolver uma estratégia para o controle da broca, um gene (669 pb) que codifica um inibidor de α -amilase de *P. coccineus*, denominado, α AI-Pc foi clonado. A sequência de aminoácidos apresentou 96% de identidade com o α AI-1 de *P. vulgaris*. O gene α AI-Pc sob o controle do promotor semente específico da fitohemaglutinina foi inserido em planta de fumo via *Agrobacterium tumefaciens*. A presença da proteína recombinante em semente de fumo transgênico foi confirmada através de análises por PCR e Western blot e sua expressão foi quantificada por testes ELISA, mostrando uma variação de 0,02 a 0,05 % de proteína solúvel total. A atividade da proteína foi testada *in vitro* contra α -amilase da broca-do-café mostrando inibir fortemente a atividade enzimática. Bioensaios estão sendo desenvolvidos para estudar o efeito do inibidor sobre o desenvolvimento do inseto alvo. Estes dados demonstraram o potencial biotecnológico do inibidor α AI-Pc na transformação de plantas de café visando a obtenção para ser utilizado conferindo resistência à broca-do-café.

INTRODUÇÃO

As sementes são importantes fontes de proteínas, carboidratos e lipídeos, propriedades estas que fazem com que as sementes sejam consideradas alimentos de excepcional qualidade para uma multiplicidade de organismos, incluindo os seres humanos, diferentes espécies de animais e invertebrados, particularmente os insetos. A perda na produção da agricultura mundial, devido ao ataque de pragas e patógenos, chegam a 37%, sendo 13% desta perda causado principalmente pelo ataque de insetos-praga (Gatehouse *et al.*, 1992). As plantas possuem um variado grau de resistência a insetos e por muitos anos tem se estudado a biossíntese e a regulação de compostos químicos associadas com estas defesas. Entre esses compostos estão incluídas as proteínas como as quitinases, as lectinas e os inibidores de enzimas digestivas (Ryan, 1990). Mesmo na presença de fatores de defesa tão variados, alguns insetos-praga, como os bruquídeos, são capazes de

infestar sementes de leguminosas. Questiona-se desta maneira, o porquê destas defesas serem ineficientes a predação destes insetos. Em alguns casos, estes compostos estão presentes em acessos selvagens em altos níveis, quando domesticados estes acessos perdem ou reduzem a capacidade de sintetizá-los (Hilder *et al.*, 1987). Outro fato importante é a co-evolução dos insetos e plantas, explicada pela teoria de Erlich e Raven (1964), o qual sugere que a produção e o acúmulo de uma toxina pela planta são seguidos por uma resposta do predador. As proteínas, com efeito inseticida devem ser ingeridas para tornarem-se efetivas, e o sítio alvo de muita delas é o sistema digestivo do inseto. Mesmo assim, algumas espécies de insetos tornam-se resistentes aos compostos de defesa presentes na planta e rapidamente tornam-se dominantes, como observado com carunchos do feijão e outros insetos pragas (Venugopal *et al.*, 2000).

O manejo do controle de pragas de grãos armazenados envolve, principalmente, as boas condições de armazenamento dos grãos e o uso de agentes químicos. Atualmente, genes de diferentes origens e que conferem resistência a insetos podem ser introduzidos em plantas de interesse econômico para reduzir sua susceptibilidade. A transferência gênica constitui um método alternativo para o controle de pragas e doenças, com vantagem adicional em termos de custos, bem-estar ambiental e da saúde humana. Os inibidores de α -amilases (α AI) e de proteinases apresentam grande potencial por reduzirem ou impedirem a atividade das enzimas digestivas dos insetos, causando-lhes desnutrição, redução do desenvolvimento larval e dependendo dos níveis de expressão podem causar a morte. Em 1987, Hilder e colaboradores obtiveram as primeiras plantas transgênicas de tabaco que expressavam um gene de inibidor de proteinase serínica de *Vigna unguiculata* mostrando resistência ao inseto *Heliothis virescens*, desde então, muitas outras plantas de interesse comercial foram transformadas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Construção do Vetor

O DNA genômico extraído de folhas jovens de *P. coccineus* foi utilizado como molde para a amplificação do gene (α AI-*Pc*) que codifica o inibidor de α -amilase. Devido à alta homologia de seqüências de aminoácidos entre os inibidores de feijão, foi utilizado oligonucleotídeos iniciadores específicos das extremidades 5' e 3' da seqüência gênica do α AI-1 de *P. vulgaris*. O produto de PCR (669 pb) foi clonado no vetor PGEMt-easy (Promega). Em seguida, novos oligonucleotídeos foram construídos de forma a adicionar na extremidade 5' do gene α AI-*Pc* um sítio de restrição para *Bsm* I e o peptídeo sinal do inibidor α AI-1 e na extremidade 3' um sítio de restrição para *Xba* I e códon de terminação. O produto de PCR (750 pb) foi clonado no vetor pTA-2 (Grossi-de-Sá *et al.*, 1997) contendo o promotor semente específico da fitohemaglutinina, PHA-L (550 pb). Finalmente, o fragmento de DNA (1300 pb), digerido com *Hind* III e *Eco*R I, foi clonado no vetor para transformação de planta pCAMBIA 1390 contendo o terminador da Nopalina Sintase .

Transformação de tabaco

O vetor pCAMBIA 1390/ α AI-*Pc* foi introduzido em plantas de fumo (*Nicotiana tabacum*) via *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105. Explante foliar foram transformados utilizando o método descrito por Horsh *et al* (1985), com algumas modificações.

Extração Protéica

A proteína recombinante foi extraída de sementes (250 mg) de fumo transgênico, utilizando o método descrito por Grossi de Sá *et al* (1997). A concentração de proteína foi determinada de acordo com Bradford (1976).

Análises Imunológicas

Utilizando extrato protéico de sementes de fumo, eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE), 13%, foi realizado como descrito por Shagger e von Jagon (1987). A presença da proteína α AI-Pc foi identificada por Western blot (Sambrook *et al.*, 1989). Anticorpo policlonal de soro de coelho contra α AI-1 (Grossi-de-Sá *et al.*, 1997) foi utilizado, seguido do anticorpo secundário goat anti IgG conjugada a peroxidase (Bio-Rad). Para quantificar a expressão da proteína recombinante foi utilizado o método ELISA (Ausubel *et al.*, 1989), microplacas foram sensibilizadas com 100 μ g de proteínas total. Anticorpo policlonal de soro de coelho contra α AI-1 foi utilizado como anticorpo primário e goat anti IgG de coelho conjugado a fosfatase alcalina como anticorpo secundário. Como substrato foi utilizado o *p*-nitrofenil fosfato (Sigma). Uma curva com concentrações definidas da proteína purificada extraída do gel SDS-PAGE foi utilizada como padrão.

Atividade Inibitória da Proteína Recombinante

A atividade da proteína recombinante contra a α -amilase da broca-do-café foi medida utilizando o método de DNS (dinitrosalicylic acid) adaptado por Bernfeld (1955). O ensaio contém 1 unidade da atividade da α -amilase do extrato total da broca-do-café e 200 μ g de proteína do extrato total de sementes de fumo. A reação ocorreu por 20 min a 37 °C.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O gene α AI-Pc com 669 pb clonado do acesso selvagem de *P. coccineus* codifica um inibidor de α -amilase com 223 aminoácidos. O valor estimado do pI desta proteína madura é de 5.02 e uma massa molecular (Mw) de 24.8 kDa. A sequência de aminoácidos possui alta identidade com os inibidores de α -amilase de *P. vulgaris*, apresentando 96% de identidade com inibidor α AI-1 e 74% com o α AI-2, já bastante estudados. Este gene sobre o controle do promotor semente específico da fitohemaglutinina foi introduzido em tabaco via *Agrobacterium*. O processo de transformação resultou em 14 transformantes onde a presença do gene foi inicialmente confirmada pela amplificação por PCR.. Western blot (figura 1) utilizando extrato protéico das sementes dos transformantes mostrou vários polipeptídeos, os quais foram sintetizados e processados com massa molecular de aproximadamente 10 a 19 kDa. Esta variação é provavelmente o resultado dos diferentes níveis de glicosilação que ocorre naturalmente com os α Als encontrados em feijão comum, os quais são processados a partir de uma pro-proteína precursora de 35 kDa (Moreno e Chrispeels, 1986). Este processo é essencial para a atividade biológica da proteína (Pueyo *et al.*, 1993). O nível de expressão da proteína recombinante foi quantificado através de teste ELISA (figura 2) mostrando uma variação de 0,02 a 0,05 % de proteína solúvel. Esta expressão é muita baixa quando comparada à expressão do inibidor α -AI em sementes de plantas de fumo (Altabella e Chrispeels, 1990), feijão (Ishimoto *et al.*, 1996) e de ervilhas (Schroeder *et al.*, 1995; Morton *et al.*, 2000) variando de 0.08 a 3%, sendo quantificado por métodos indiretos. A atividade da proteína (figura 3) foi testada *in vitro* contra a α -amilase da broca-do-café. A proteína presente em todos os transformantes, embora expressa em baixa quantidade, inibiu fortemente a atividade da enzima digestiva. Os resultados aqui obtidos mostraram que a proteína recombinante foi expressa e processada com atividade nas sementes de tabaco.

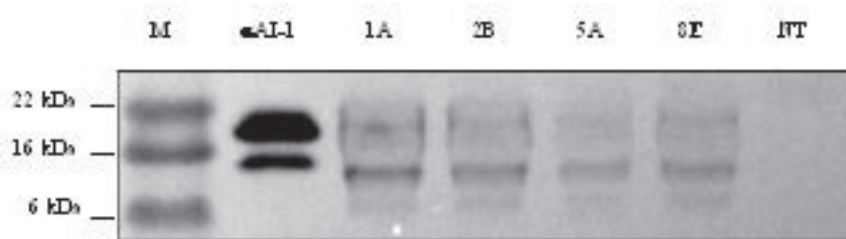


Figura 1: Análise da proteína recombinante α AI-Pc por Western Blot em extrato protéico de semente de fumo. M - marcador de peso molecular; α AI-1- controle positivo; 1A, 2B, 5A, 8E - transformantes; NT – controle negativo.

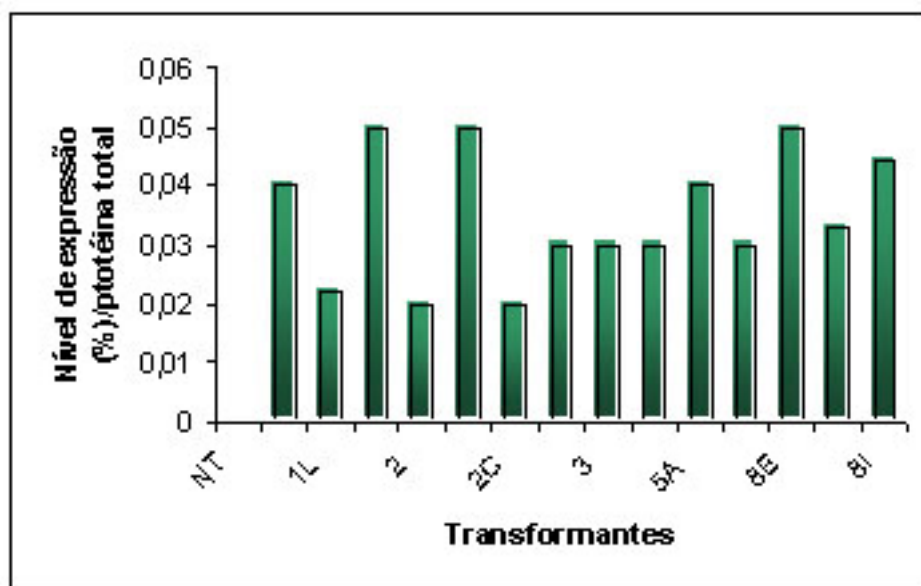


Figura 2: Expressão da proteína α AI-Pc em extrato protéico de sementes de fumo analisada por ELISA. 100 mg de proteína solúvel de semente dos transformantes (1A, 1L, 1M, 2, 2B, 2C, 2J, 3, 4, 5A, 6C, 8E, 8F, 8I) foram ensaiadas utilizando anticorpo policlonal de soro de coelho contra α AI-1.

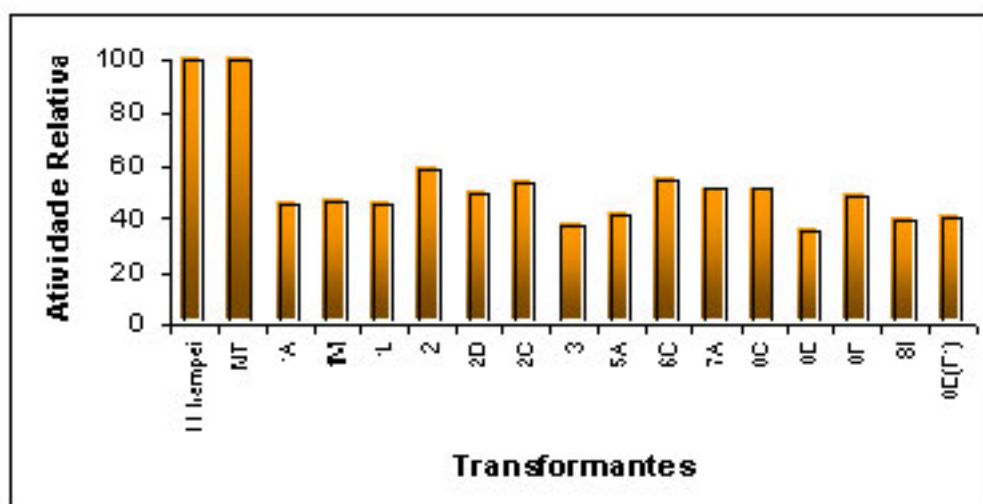


Figura 3: Atividade inibitória da proteína α AI-Pc expressa em extrato protéico de semente de fumo contra amilase da broca-do-café (*H. hampei*). Transformantes (parental: 1A, 1L, 1M, 2, 2B, 2C, 2J, 3, 4, 5A, 6C, 7A, 8C, 8E, 8F, 8I e progêne: 8E(F1)) e Não transformantes (NT)

PERSPECTIVAS

Os inibidores de α -amilases têm sido propostos como um dos principais fatores de defesa das plantas contra bruquídeos. A utilização de genes que codificam inibidores de enzimas digestivas para a obtenção de plantas resistentes contra o ataque de inseto é uma estratégia bastante promissora, que vem sendo incluída nos programas de melhoramento genético de plantas. Com o sucesso dos resultados alcançados, espera-se obter plantas de café transgênicos e expressando o inibidor α AI-Pc com resistência a broca-do-café. Os próximos passos serão dados a transformação de plantas de café (*C. canephora* e *C. arabica*) com este gene, utilizando os protocolos de transformação via *Agrobacterium* e Bombardeamento, já estabelecidos no Laboratório de Transformação Genética de Plantas da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnológicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTABELLA, T. & CHRISPEELS, M. J. Tobacco plants transformed with the bean α ai gene express an inhibitor of insect α -amylase in their seeds. **Plant Physiology**, v.93, p.805–810, 1990
- AUSUBEL, F.M.; BRENT, R. & KINGSTON, R. E. Current protocols in Molecular **Biology Journal Wiley and Sons**, New York, 1987
- BERNFELD, P. Amylase, α and β . **Methods Enzymol.** v.1, p.149-158, 1955.
- BRADFORD, M. M.. A rapid and sensitive method for quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.
- EHRlich, P. R. & RAVEN, P. H. Butterflies and Plants: a study in coevolution, **Evolution**, v.18, 1964.
- GATEHOUSE, A.M.R.; BOULTER D. & HILDER, V.A. Potential of Plant-derived Genes in the Genetic Manipulation of Crops for Insect Resistance. *Biotechnology in Agriculture* Nº 7: Plant Genetic Manipulation for Crop Protection, CAB International, p.155-181, 1992.
- GROSSI-DE-SÁ, M.F.; MIRKOV, T.E.; ISHIMOTO, M.; COLUCCI, G.; BATEMAN, K.S. & CHRISPEELS, M.J. Molecular characterization of a bean α -amylase inhibitor that inhibits the α -amylase of the Mexican bean weevil *Zabrotes subfasciatus*. **Planta**, v.203, p.295-303, 1997.
- HILDER, V.A.; GATEHOUSE, A.M.R.; SHEERMAN, S.E.; BARKER R.F. & BOULTER, D. A. novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. **Nature**, v.330, p.160-163, 1987
- HORSH, R.B.; FRY, J.E.; HFFMAN, N.L.; EICHOLTZ, D. ROGERS, S.G. & FRALEY, R.T. A simple and general method for transferring genes into plants, **Science**, v.227, p.1229-1231, 1985.
- ISHIMOTO, M.; SATO, T.; CHRISPEELS, M. J. & KITAMURA, K. Bruchid resistance of transgenic azuki bean expressing seed α -amylase inhibitor of common bean. **Entomol. Exp. Appl.** V.79, p.309–315, 1996.
- KONCZ, C. & SCHELL, J. The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. **Molecular and General Genetics**, v.204, p.383-396, 1986.
- MORENO, J. & CHRISPEELS, M. J. A lectin gene encodes the α -amylase inhibitor of the common bean. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.86, p.7885-7889, 1989.
- MORTON, R.L.; SCHROEDER, H.E.; BATEMAN, K.S.; CHRISPEELS, M.J.; ARMSTRONG, E. & HIGGINS, T.J.V. Bean α -amylase inhibitor 1 in transgenic peas (*Pisum sativum*) provides complete protection from pea weevil (*Bruchus pisorum*) under field conditions,

Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, v.97(8), p.3820-3825, 2000.

PUEYO, J.J.; HUNT, D.C. & CHRISPEELS, M.J. Activation of bean (*Phaseolus vulgaris*) α -amylase inhibitor requires proteolytic processing of the pro-protein. **Plant Physiology**, v.101, p.1341-1348, 1993.

RYAN, C.A. Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. **Ann. Rev. Phytopathol.** 28, 425–440, 1990.

SCHAGGER, H.; VON JAGOW, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa, **Anal. Biochem**, v. 166, p.368-379, 1987.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. & MANIATS, T. Molecular Cloning: a laboratory Manual. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SCHROEDER, H.E.; GOLLASH, S.; MOORE, A.; TABE, L.M.; CRAIG, S.; HARDIE, D.; CHRISPEELS, M.J.; SPENCER, D. & HIGGINS, T.J.V. Bean α -amylase inhibitor confers resistance to the pea weevil, *Bruchus pisorum*, in genetically engineered peas (*Pisum sativum* L.), **Plant Physiology**, v.107, p.1233-1239, 1995

03 - INIBIDORES DE α -AMILASES E SEU POTENCIAL NO CONTROLE DO BICUDO DO ALGODOEIRO (*Anthonomus grandis*)

Dias, S.C.^{1,2,3}; Franco, O.L.³; Silva, M.C.M.¹; Magalhães, C.P.¹; Oliveira Neto, O.B.¹; Laumann, R.A.¹; Figueira, E.L.Z.¹ e Grossi de Sá, M.F.^{1,3}

¹EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia; ²Universidade de Brasília, Departamento de Biologia Celular; ³Universidade Católica de Brasília.

RESUMO

Os inibidores de α -amilases são proteínas amplamente distribuídos em plantas que têm despertado grande interesse devido ao potencial que apresentam interferindo nos processos digestivos de insetos-praga. Um novo gene para inibidor de α -amilase (BIII) foi isolado a partir de centeio (*Secale cereale*). Este inibidor possui 354 nucleotídeos e codifica para uma proteína de 118 aminoácidos. Um fragmento de 313 pb deste gene foi expresso em *Escherichia coli* e a proteína recombinante mostrou atividade contra as α -amilases de larvas de *A. grandis* e de outras importantes insetos-praga. Resultados do bioensaio utilizando a proteína recombinante, adicionada na dieta em quatro diferentes concentrações (0.05, 0.2, 0.48 e 0.89%) mostraram uma redução do peso dos insetos, além de uma significativa mortalidade larval na concentração mais elevada da proteína. Paralelamente, o gene sobre o controle do promotor da fitohemaglutina foi introduzido em plantas de tabaco via *Agrobacterium tumefaciens*. A expressão da proteína heteróloga foi detectada em sementes por métodos imunológicos e ensaios *in vitro* demonstrando atividade contra as α -amilases do intestino do bicudo do algodoeiro. Os resultados obtidos sugerem que este inibidor representa um grande potencial de uso na obtenção de plantas de algodão transgênico visando o controle do bicudo do algodoeiro.

INTRODUÇÃO

As α -amilases são enzimas monoméricas que catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas α -1,4 do amido, glicogênio e outros carboidratos. Essas enzimas são essenciais ao crescimento e ao desenvolvimento de muitos insetos, especialmente daqueles que vivem em sementes e grãos ricos em amido (Oliveira Neto *et al.*, 2003).

Os inibidores de α -amilase são encontrados em microrganismos, plantas e animais. podendo inibir α -amilase de mamíferos e de insetos em plantas são encontradas principalmente em gramíneas como trigo, sorgo, cevada, arroz, como também em leguminosas como o feijão (Franco *et al.*, 2002). A importância que os inibidores de enzimas digestivas possuem na degradação de moléculas e na interferência no processo digestivo dos insetos tem sido vastamente documentado (Jongsma e Bolter, 1997). Inúmeros são os relatos de genes expressando proteínas com atividade inseticida contra α -amilases, sendo que alguns destes genes já foram introduzidos em plantas de interesse agrônomo mostrando resultados promissores no controle de insetos-praga (Morton *et al.*, 2000).

O *Anthonomus grandis*, conhecido como bicudo do algodoeiro, é uma das pragas mais importantes da cultura do algodão. Todas as fases da vida do bicudo ocorrem no interior do botão floral ou da maçã. Estes locais servem como fonte de alimento e proteção ao inseto. A principal forma de controle desta praga tem sido feita pela utilização de produtos químicos, cuja aplicação exige um grande investimento. Esses agrotóxicos, além de caros, causam danos ao meio ambiente e a saúde humana (França, 1993).

Em 2000 um novo inibidor denominado BIII foi isolado de sementes de centeio (*Secale cereale*) e sua estrutura primária parcialmente elucidada através de estudos de espectrometria de massa, determinação e comparação da sequência amino terminal (Iulek *et al.*, 2000). Ensaios de atividade inibitória *in vitro* detectaram atividade deste inibidor contra as α -amilases de insetos bruquídeos (Iulek *et al.*, 2000). Posteriormente, também foi

observado que este inibidor era capaz de inibir 90% das α -amilases existentes no intestino de larvas de *A. grandis* (Oliveira-Neto *et al.*, 2003).

O presente trabalho mostra a clonagem do inibidor BIII e a sua expressão em células de *E. coli* e plantas de fumo, onde foi demonstrada a eficiência da proteína recombinante contra larvas do bicudo do algodoeiro

MATERIAL E MÉTODOS

Clonagem do gene BIII

Para a amplificação do fragmento gênico de 311 pares de bases que codifica o inibidor BIII utilizou-se a técnica de PCR. Os dois oligos nucleotídeos iniciadores utilizados foram desenhados em base no alinhamento de seqüências que apresentavam homologia com a seqüência parcial do inibidor BIII obtidos por sequenciamento do N-terminal (Iulek *et al.*, 2000). Para obter a região 3' do gene foram utilizados dois oligos nucleotídeos iniciadores específicos e um oligo nucleotídeo degenerado baseado nas seqüências 3' consenso de outros inibidores α -amilase/tripsina, resultando em um fragmento de 187 pb.

Expressão heteróloga em E. coli e plantas de tabaco

Foi utilizado o vetor pET102D-TOPO[®] (Invitrogen) e células BL 21(DE3)pR_YL foram transformadas por choque térmico para expressar o gene *BIII* em bactérias. Após purificação, a proteína recombinante foi utilizada para ensaios de inibição *in vitro* e *in vivo*. Para expressão em tabaco foi utilizado o vetor binário pCAMBIA onde o gene foi colocado sob o controle do promotor semente específico (fitohemaglutinina) utilizando a cepa GV3101PMP90 de *Agrobacterium tumefaciens*. A transformação de tabaco foi feita utilizando discos foliares foi feita segundo o método descrito por Silva *et al.* (2004).

Ensaio de atividade in vitro e in vivo

A atividade da proteína recombinante contra α -amilases do intestino de bicudo foi feita utilizando os métodos DNS e iodométrico. Ensaio contra proteinases de *Spodoptera frugiperda*, *A. grandis*, tripsina e quimiotripsina bovina e proteinases de *Streptomyces* foram realizadas segundo método de Kakade *et al.* 1969. O bioensaio foi feito segundo Dias *et al.* (2000), por meio da incorporação de quatro concentrações de proteína recombinante (0.05%, 0.2, 0.45% e 0.89%, w/v) na dieta artificial de bicudo. Foram analisados a porcentagem de mortalidade larval e parâmetros biológicos do inseto alimentado com a dieta como fecundidade, peso e tamanho dos adultos.

Quantificação da proteína recombinante em sementes de fumo

O nível de expressão obtido nas sementes de tabaco foi detectado pelo método de ELISA, segundo Deutcher, (1990) utilizando como anticorpo primário, o anticorpo policlonal produzido em camundongo contra a proteína expressa em *E. coli*, conforme descrito anteriormente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O gene para o inibidor BIII foi isolado utilizando a técnica de amplificação de PCR a partir de DNA extraído das folhas de centeio. A sua seqüência N-terminal da proteína deduzida mostrou homologia com a obtida por Iulek *et al.* (2000), confirmando ser o mesmo inibidor descrito anteriormente. O gene possui 354 pb e codifica para uma proteína de 118

aminoácidos. A massa molecular predita é de 11.50 kDa com um pI estimado de 5.30. A sequência de aminoácidos quando comparada com outros inibidores mostrou 91% a 88% de identidade com inibidores α -amilases/tripsina, isoladas de centeio denominadas de CM proteínas. Estas proteínas foram anteriormente isoladas de trigo e cevada (Barber *et al.*, 1986, García-Maroto *et al.*, 1990), entretanto o inibidor BIII foi o primeiro membro deste grupo, isolado de centeio.

Um fragmento de 311 pares de bases deste gene foi expresso em células de *E. coli* como uma proteína de 27,5 kDa (figura 1A). A proteína recombinante foi expressa após 2, 4 e 6 horas de indução com 0,5 mM de IPTG a 37°C e posteriormente purificada em coluna de afinidade de níquel (figura 1B). Ensaios de inibição *in vitro* com proteinases serínicas de diferentes fontes confirmaram os resultados da ausência de inibição relatados por Lulek *et al.*, 2000, apesar a sequência protéica apresentar homologia com os inibidores de dupla função. A ausência da atividade inibitória sobre proteinases deste inibidor pode ser explicada pela falta dos resíduos Arg 34 e Leu 35 presente no sítio ativo de proteinases, típico de inibidores bifuncionais (Lyons *et al.*, 1987)

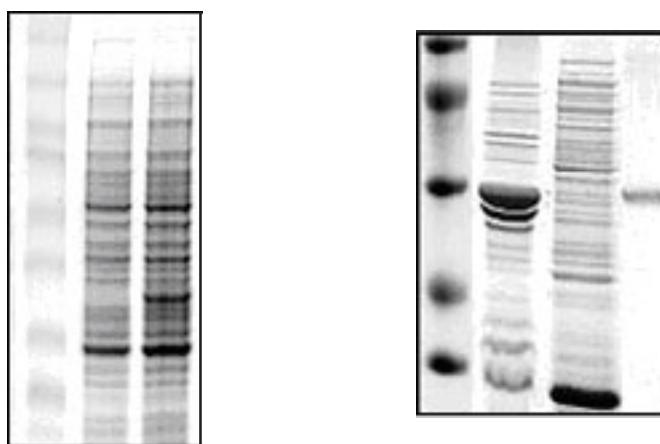


Figura 1: (A) Análise a 12% de gel SDS PAGE de células de *E. coli* induzidas por 3 horas a 37°C. Poço 1: Marcador molecular. Poço 2: Extrato não induzido após 3 horas. Poço 3: Extrato induzido com 0.5 mM de IPTG após o mesmo tempo. (B): Expressão e purificação em *E. coli*. Poço 1: Marcador molecular. Poço 2: Extrato solúvel. Poço 3: lavado com 10 mM de imidazol. Poço 4: Lavado com 250 mM de imidazol

Índices significativos de mortalidade (84%) foram observados quando larvas neonatas se alimentaram da dieta contendo 0.89% (p/v) de proteína recombinante. Também foi observada uma diminuição de 38,6% do peso dos insetos quando estes se alimentaram da dieta contendo a mesma concentração de proteína entretanto não foram observadas mudanças no tamanho, longevidade e fecundidade dos insetos. Ensaios imunológicos realizados mostraram que o fragmento introduzido em plantas de fumo foi corretamente processado nas sementes com um nível de expressão que variou de 0,10 a 0,29%. Ensaios de atividade inibitória *in vitro* da proteína recombinante contra α -amilases de bicudo revelaram atividade inibitória entre 23 a 41%.

PERSPECTIVAS

A inibição de enzimas digestivas de insetos predadores é uma alternativa para a proteção de plantas. Entretanto, como o espectro de inibição destas moléculas é amplo, a busca de inibidores mais potentes e estudos interação molecular destes inibidores com as enzimas do inseto podem contribuir para o entendimento de suas especificidades. Ensaios de inibição *in vitro* e *in vivo* demonstraram o potencial do inibidor BIII impedindo o desenvolvimento do bicudo do algodoeiro, abrindo perspectivas para sua utilização em

projetos visando a transformação de plantas de algodão como uma das estratégias a ser utilizada no controle deste inseto. Outra perspectiva é a utilização das proteínas recombinantes para o estudo de interação molecular entre inibidores e enzima, contribuindo para uma melhor interpretação dos fatores de interação enzimática e especificidade. Este estudo poderia ser feito utilizando a técnica de mutagênese sítio dirigida onde seriam conhecidos os domínios desta proteína ampliando os conhecimento acerca dos resíduos e sítios ativos envolvidos na interação enzimática.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- BARBER, D.; SANCHEZ-MONGE, R.; MENDEZ, E.; LAZARO, A.; GARCÍA-OLMEDO, F.; SALCEDO, G. New α -amylase and trypsin inhibitors among the CM-proteins of barley (*Hordeum vulgare*). **Biochimica and Biophysica Acta**, v. 869, p. 115-118, 1986.
- CARLINI, C. R.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Plant toxic protein with insecticidal properties: A review on their potentialities as bioinsecticides. **Toxicon**, v.40, n. 11, p. 1515-1539, 2002.
- DIAS, S.C, OLIVEIRA-NETO, O.B; GROSSI-DE-SÁ, M.F; MONERAT, R.G. Desenvolvimento de metodologias de bioensaios utilizando *Bacillus thuringiensis* contra o bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis*) . EMBRAPA. **Comunicado Técnico**, v. 42. p 1-5. 2000.
- DEUTCHER, M.P. In : **Methods in Enzymology. Guide to protein purification**. Ed: Abelson, J.N and Simon, M.I. Academic Press, Inc. San Diego, California. 891p. 1990.
- GARCÍA-MAROTO, F.; CARBONERO, P.; GARCIA-OLMEDO, F. Site-directed mutagenesis and expression in *Escherichia coli* of WMAI-1, a wheat monomeric inhibitor of insect α -amylase, **Plant Molecular Biology**, v. 17, p. 1005-1011, 1991.
- IULEK, J.; FRANCO, O. L.; SILVA, M.; SLIVINSKI, C. T.; BLOCH JR., C.; RIGDEN, D. J.; GROSSI-DE-SÁ, M.F. Purification, biochemical characterisation and partial primary structure of a new α -amylase inhibitor from *Secale cereale* (Rye), **International Journal Biochemistry and Cell Biology**, v. 32, p. 1195-1204, 2000.
- JONGSMA, M. A.; Bolter, C. J. The adaptation of insects to plant protease inhibitors. **Journal Insect Physiology**, v. 43, p. 885-896, 1997.
- KAKADE M. L., SIMONS N. R. AND LIENER I. E. The evaluation of natural vs synthetic substrates for measuring the antitryptic activity of soybean samples. **Cereal Chemistry** v. 46, p. 518-526. 1969.
- LYONS, A.; RICHARDSON, M.; TATHAM, A.S.; SHEWRY, P.R. Characterization of homologous inhibitors of trypsin and α -amylase, **Biochimica and Biophysica Acta**, v. 915, p. 305-313, 1987.
- MORTON, R. L.; SCHROEDER, H. E.; BATEMAN, K. S.; CHRISPHEELS, M. J.; ARMSTRONG, E.; HIGGINS, T. J. V. Bean α -amylase inhibitor 1 in transgenic peas (*Pisum sativum*) provides complete protection from pea weevil (*Bruchus pisorum*) under field conditions. **Proceeding of the National Academy of Sciences USA**, v. 97, n. 8, p. 3820-3825, 2000.
- OLIVEIRA-NETO, O.B.; BATISTA, J.A.N.; RIGDEN, D.J.; FRANCO, O.L.; FALÇÃO, R.; FRAGOSO, R.R.; MELLO, L.V.; DOS-SANTOS, R.C.; GROSSI-DE-SÁ, M.F. Molecular cloning of α -amylases from Cotton boll weevil, *Anthonomus grandis* and structural relations to plants inhibitors: an approach to insect resistance. **Journal of Protein Chemistry**, vol. 22, n.1, p. 77-87, 2003.
- SCHROEDER, H.E.; GOLLASH, S.; MOORE, A.; TABE, L.M.; CRAIG, S.; HARDIE, D.; CHRISPHEELS, M.J.; SPENCER, D.; HIGGINS, T.J.V. Bean α -amylase inhibitor confers resistance to the pea weevil, *Bruchus pisorum*, in genetically engineered peas (*Pisum sativum* L.) **Plant Physiology**, v.107, p. 1233-1239, 1995.
- SILVA, M. C. M., MELLO, L.V.; MARISE, V. C.; RIGDEN, D. J.; GORAN, N.; CHRISPHEELS, J.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Mutants of common bean α -amylase inhibitor-2as an approach to investigate binding specificity to α -amylases. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, n.30, p.201-208, 2004.

04 - CLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE UMA PROTEINASE SERÍNICA ATIVA DE *Zabrotes subfasciatus* (COLEOPTERA:BRUCHIDAE) EM *E.coli*

Magalhães, C. P.¹; Souza, D. S. L.^{1,2}; Fragoso, R. R.^{1,2}; Franco, O. L.³ e Grossi-de-Sá, M. F.¹

¹EMBRAPA – Recursos Genéticos e Biotecnologia; ²UnB - Universidade de Brasília, Departamento de Biologia Celular, ³ Universidade Católica de Brasília, UCB

RESUMO

Inúmeras estratégias têm sido utilizadas para a redução dos danos de insetos-pragas em plantas, incluindo a produção de variedades resistentes, pela introdução de genes que codificam as proteínas cry de *Bacillus turringiensis* e os fatores antinutricionais. Porém, a capacidade dos insetos de se sobreporem a essas estratégias, através da inativação da proteína tóxica ou da expressão de novas enzimas digestivas resistentes aos inibidores proteolíticos, tem sido relatada. O inseto *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera:Bruchidae) o qual ataca sementes do feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), feijão de corda (*Vigna unguiculata*) e ervilha (*Pisum sativa*) possui diferentes classes de proteinases no seu trato digestivo e este fato pode explicar o porque deste inseto se alimentar de diferentes dietas. O estudo das enzimas proteolíticas presentes neste inseto é fundamental na busca de estratégias para o seu controle. O presente trabalho mostra pela primeira vez a clonagem de um gene para uma serino proteinase de *Z.subfasciatus* e sua expressão em *E.coli* na sua forma ativa. O gene inteiro de uma tripsina de *Z.subfasciatus* (ZSTryp) foi obtido utilizando técnicas de RT-PCR e 5' e 3' RACE. O gene correspondendo à região pro-madura da proteína foi clonada no vetor pET 101, e inserida em célula de *E.coli* BL21(DE3). A expressão foi induzida com IPTG 1mM. Após purificação a proteína foi ativada em tampão oxidativo por 24h, dializado e a enzima recombinante contendo 29kDa apresentou maior atividade em pH 8.0. A atividade proteolítica foi inibida com o inibidor sintético PMSF, específico de proteinase serínica.

INTRODUÇÃO

Insetos fitofagos usam diferentes classes de enzimas proteolíticas para promover a digestão de diversos tipos de alimentos. O inseto *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera:Bruchidae) o qual ataca sementes do feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), feijão de corda (*Vigna unguiculata*) e ervilha (*Pisum sativa*) possui no seu trato digestivo diferentes classes de proteinases (Silva *et al.* 2001) e este fato pode explicar a capacidade deste inseto de se alimentar de diferentes dietas. Trabalhos mostram que os insetos alimentados com dietas contendo inibidores de proteinases (PI) produzem novas enzimas digestivas insensíveis à ação dos inibidores. A síntese de enzimas digestivas do tipo tripsina em resposta à presença de PI foram observadas em *Heliothis virescens* e *Spodoptera frugiperda* (Paulillo *et al.*, 2000; Brito *et al.* 2001). Contudo, as proteinases serínicas de coleópteros têm sido pouco caracterizadas e nenhuma estrutura cristalizada foi determinada. Quando uma proteína heteróloga, especialmente proteínas complexas contendo múltiplas pontes dissulfeto, é expressa em *E. coli*, grande parte do produto de expressão se deposita como corpos de inclusão, na forma insolúvel e inativa. Apesar disso, muitas proteínas que possuem pontes dissulfeto, incluindo proteinases serínicas já foram corretamente ativadas, através do uso de tampões oxidantes (Hohenblum *et al.* 2004). A obtenção da proteinase serínica recombinante ativa de *Z.subfasciatus* será útil no estudo da atividade da enzima frente a diferentes substratos e na análise da interação molecular com os inibidores de enzimas proteolíticas. Este artigo mostra pela primeira vez a clonagem de um gene que codifica uma proteinase serínica de *Z. subfasciatus* e sua expressão em *E.coli* na sua forma ativa.

MATERIAL E MÉTODOS

Clonagem do gene da proteinase serínica de Z. subfasciatus

O cDNA de larvas de *Z. subfasciatus* foi utilizado como molde para uma reação de PCR, utilizando oligonucleotídeos degenerados elaborados com base em seqüências conservadas de proteinases serínicas de insetos. O gene completo da proteinase serínica de *Z. subfasciatus* (ZSTryp) foi obtido através de amplificação por PCR utilizando a técnica de 5' e 3' RACE (PCR).

Expressão de ZSTryp em E.coli

O cDNA codificando a região pro-madura de ZSTryp foi ligado no vetor de expressão pET101 (Invitrogen) e inserido por choque térmico em *E. coli*, cepa BL21 (DE3) (Invitrogen) conforme a orientação do fabricante. A expressão foi efetuada em um frasco de 2 litros, contendo 500 ml de meio LB suplementado com 100 mg/ml de ampicilina. As células foram crescidas sob agitação (200 rpm) até uma densidade de $O.D._{600} = 0,6-0,8$. A expressão da proteína recombinante foi induzida com 1mM IPTG. Amostras foram coletadas em diferentes tempos e o nível de expressão foi analisado por SDS-PAGE.

Purificação e ativação da proteína recombinante ZSTryp

A purificação de ZSTryp foi efetuada em coluna de Ni^{2+} para ligação com cauda de histidina em condições desnaturantes. A proteína expressa foi eluída com o mesmo tampão desnaturante, contendo imadazol 200mM. O material eluído foi reduzido pela adição de DTT em concentração final de 5mM e adicionado por gotejamento, sob agitação, em um tampão oxidante contendo 100mM Tris-HCl, pH 8.0, 3 mM GSSG, 5 mM GSH. A proteína ativa foi dializada contra água e liofilizada.

Atividade proteolítica da enzima recombinante

A atividade proteolítica foi determinada usando azocaseína como substrato (Tomarelli *et al*, 1949). O grupo sulfanilamida liberado após hidrólise foi mensurado a 440 nm.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diferentes estratégias vêm sendo utilizadas visando a redução dos danos de insetos em plantas, incluindo a produção de variedades resistentes, através da inserção de genes que codificam proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis* e fatores antinutricionais. Porém, plantas contendo estes fatores não são eficazes no controle de insetos coleópteros. A capacidade de se sobrepor a essas estratégias através da inativação da proteína tóxica ou da expressão de proteinases serínicas resistentes aos inibidores enzimáticos tem sido relatada em *Phaedon cochleariae* e *Z. subfasciatus* (Girard *et al.*, 1998; Grossi-de-Sá e Chrispells, 1997). A presença de proteinases serínicas além das proteinases aspartícas e cisteínicas no trato digestivo de *Z. subfasciatus* pode explicar o fato dele se desenvolver em sementes que contém inibidores de proteinases e inibidores de α -amilases. O trabalho desenvolvido mostra pela primeira vez a expressão na sua forma ativa de uma proteinase serínica de inseto em *E.coli*. A seqüência nucleotídica obtida por PCR de ZSTryp referente às regiões pré, pro e madura codifica uma proteína de 261 aminoácidos. A proteína madura deduzida apresenta 227 aminoácidos e uma massa molecular teórica de 24 kDa e pI de 8,6. Esta proteína apresenta o tamanho semelhante a provável tripsina deduzida do cDNA de *P. cochleariae*, cujo pI é de 4,7 (Girard e Juanin, 1999). O alinhamento de aminoácidos de ZSTryp com outras tripsinas de insetos mostrou uma similaridade inferior a 50%, sendo a tríade catalítica His, Asp, Ser, altamente conservada. A tríade específica para tripsinas Asp, Gly, Gly também é altamente conservada entre as seqüências e a presença de 8 resíduos de cisteínas responsáveis pela formação de pontes dissulfeto foram identificados (figura 1). Quando o gene desta proteína foi inserido no plasmídeo pET 101 a proteína em fusão com

His-Tag e o epítopo V5 apresentou uma massa molecular de 29 kDa (figura 2). A proteína foi expressa em grande quantidade em *E. coli* sendo visualizada após 3h de indução com IPTG e o maior nível de expressão após 12h. A proteína recombinante apresentou atividade proteolítica após purificação e tratamento com tampão renaturante, sendo sua maior atividade obtida em pH 8,0 (figura 3).

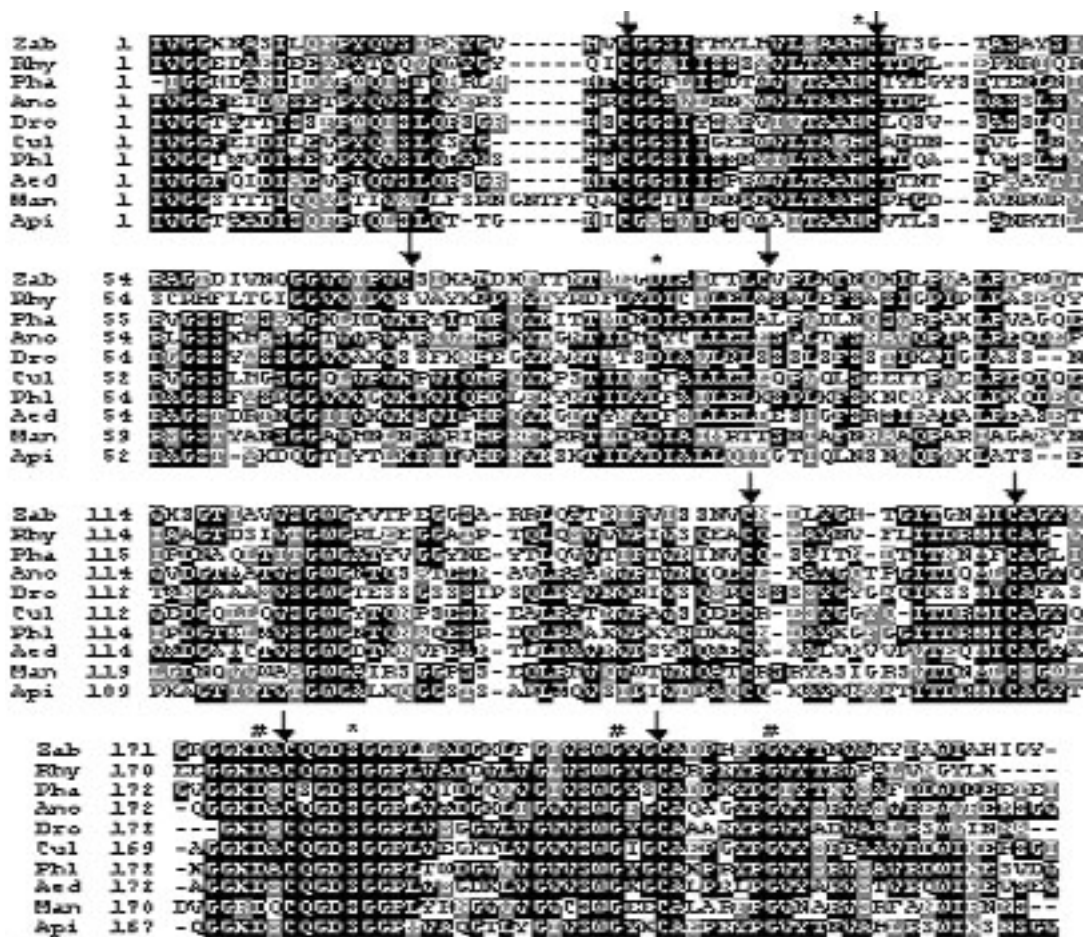


Figura 1 : Alinhamento entre as seqüências de aminoácidos de ZSTryp e outras tripsinas de insetos.; rzyo - *Rhyzopertha dominica* (AAD31268); pha - *Phaedon cochleariae* (CAA76929); anop - *Anophelis gambiae* (XP_317171); cul - *Culex pipiens* (AAB37261); phl - *Phlebotomus papatasi* (AAM96942); aedis - *Aedes aegypti* (AAL93209); apis - *Apis mellifera* (XP_397087); droz- *Drosophila melanogaster* (AAA17453) and man - *Manduca sexta* (T10109). O grau de similaridade entre ZSTryp e as tripsinas de outros coleópteros foi de: ZSTryp - rzo - 41%; ZSTryp - phae - 38%.

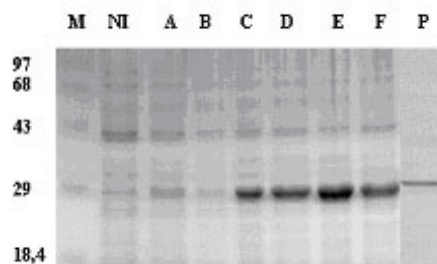


Figura 2. SDS-PAGE da análise da expressão de ZSTryp em diferentes tempos após a indução. M- marcador; NI- não induzido; A-F - 1, 2, 3, 4, 12 e 24 horas após indução. P- proteína purificada em Coluna de Ni

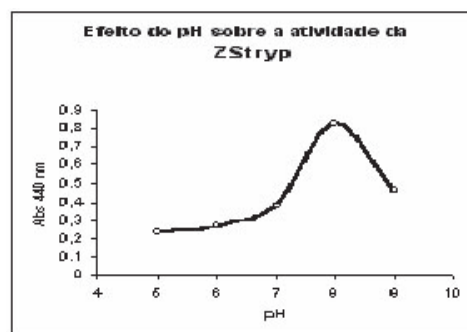


Figura 3: Efeito do pH na atividade de ZSTryp. Os tampões utilizados foram: Acetato de sódio 0,1 M, CaCl 100 mM pH 5,0, 6,0 e 7,0 tampão Tris/HCl 0,1 M, CaCl 100 mM pH 8,0 e 9,0.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- BRITO, L.O.; LOPES, A.R., PARRA, J.R.P.; TERRA, W.R., SILVA-FILHO M.C., Adaptation of tobacco budworm *Heliothis virescens* to proteinase inhibitors may be mediated by the synthesis of new proteinases. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B** v.128 p. 365-375, 2001.
- CHARNEY, J. & TOMARELLI, R.M.. A Colorimetric Method for the Determination of the Proteolytic Activity of Duodenal Juice. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 34, p. 501, 1949.
- GIRARD, C. & JOUANIN L. Molecular cloning of cDNAs encoding a range of digestive enzymes from a phytophagous beetle, *Phaedon cochleariae*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v. 29, p. 1129–1142, 1999.
- GIRARD, C.; LE METÁYER, M.; BONADÉ-BOTTINO, M.; PHAM-DELEGUE, M.H.; JOUANIN, L., High level of resistance to proteinase inhibitors may be conferred by proteolytic cleavage in beetle larvae. **Insect Biochemistry and. Molecular Biology** v. 28, p. 229–237, 1998.
- GROSSI DE SA, F. & CHRISPEELS, M.J., 1997. Molecular cloning of bruchid (*Zabrotes subfasciatus*) α -amylase cDNA and interactions of the expressed enzyme with bean amylase inhibitors. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** v. 27, p. 271–281, 1997.
- HOHENBLUM, H. ;VORAUER-UHL, K.; KATINGER, H.;MATTANOVICH D. Bacterial expression and refolding of human trypsinogen. **Journal of Biotechnology** v. 109, p. 3-11, 2004.
- JONGSMA, M. A.;BAKKER, P.L.; PETERS, J.; BOSCH, D.; STIEKMA, W.J. Adaptation of *Spodoptera exigua* larvae to plant proteinase inhibitors by induction of gut proteinase activity insensitive to inhibition. **Proceeds of National Academic of Science USA**. v. 92, p.8041-8045, 1995.
- LOSEVA, O.; IBRAHIM, M.; CANDAS, M; KOLLER, C.N.; BAUER L.S.; BULLA-JR L.A. Changes in protease activity and cry3Aa toxin binding in Colorado potato beetle; implications for insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 32 p.567-577, 2002.
- PAULILLO, L.C.M.S., LOPES, A.R., CRISTOFOLETTI, P.T.,PARRA, J.R.P., TERRA, W.R., SILVA-FILHO, M.C.,. Changes in midgut endopeptidase activity of *Spodoptera frugiperda* Lepidoptera: Noctuidae is responsible for adaptation to soybean proteinase inhibitors. **Journal of Economy and Entomology**. v. 93, 892-896, 2000.
- SILVA C.P., TERRA, W.R.;LIMA, R.M. Differences in midgut serine proteinases from larvae of the bruchid beetles *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v.1, p.18-28. 2001.
- ZHU & BAKER, J. E. Characterization of midgut trypsin-like enzymes and three trypsinogen cDNAs from the lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae) **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v. 29, p. 1053–1063, 1999.

05 - PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE TRES DIFERENTES INIBIDORES DE α -AMILASE EXTRAÍDOS DE SEMENTES DE BARU (*D. alata*), COM ATIVIDADE CONTRA ENZIMAS DIGESTIVAS DE INSETOS-PRAGA.

Bonavides, K.B.¹; Pelegrini, P.B.³; Noronha, E.F.³; Grossi-de-Sá, M.F.²; Bloch Jr. C.² e Franco, O.L.³

¹Ciências Biológicas, Universidade Católica de Brasília, ²Cenargen/Embrapa, ³Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília,

RESUMO

O bruquídeo *Callosobruchus maculatus* é uma praga que ataca o feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*) armazenado, causando severas perdas nesta cultura de subsistência. A larva apresenta ciclo de vida endofítico, tornando os inseticidas convencionais ineficazes. Assim, adotou-se a estratégia do uso de inibidores de α -amilase capazes de controlar tal praga. Para isto, as proteínas de sementes baru (*Dipteryx alata* Vog.) foram extraídas, fracionadas com sulfato de amônio (100%) e aplicadas em uma coluna de Red-Sepharose CL-6B, gerando um único pico retido. Este pico inibiu 80% da ação das α -amilases do *C. maculatus* e 70% das α -amilases de *Anthonomus grandis*, porém não houve inibição significativa contra *Acanthoscelides obtectus* e contra α -amilases de pâncreas de porco. Este pico foi aplicado em coluna de fase reversa HPLC, obtendo-se quatro picos que mostraram inibição contra *C. maculatus*, tendo o pico 3 inibição de 45%. Análise de espectrometria de massa do pico 3 proveniente do HPLC mostrou proteínas de massas moleculares de 5.260 e 6.913 Da. Resultados similares foram observados em SDS-PAGE. A obtenção destes inibidores específicos contra enzimas de insetos indica a possibilidade de construção de plantas transgênicas resistentes a insetos-pestes.

INTRODUÇÃO

O caruncho de feijão-de-corda (*C. maculatus*) causa severos danos à produção de feijão-de-corda e apresenta ciclo de vida endofítico após depositarem seus ovos nas sementes. Por isso, inseticidas convencionais são ineficazes contra esta praga, sendo necessária a descoberta de novos métodos para um controle eficiente. Larvas de *C. maculatus* dependem de α -amilases para catalizar a hidrólise das ligações α -1,4 presentes no amido das sementes. Desta forma, uma das estratégias utilizadas para controle desta praga é a utilização de inibidores de α -amilase, que são capazes de inativar a ação dessa enzima digestiva, reduzindo o crescimento do inseto e aumentando sua mortalidade. Diversas sementes apresentam elevadas concentrações de inibidores de α -amilase, especialmente as espécies selvagens, podendo estes ser classificados em seis diferentes famílias, mostrando diferentes estruturas primárias e terciárias, especificidades e mecanismos de ação. Por essa razão, foram estudadas sementes de baru (*D. alata* Vog.), uma típica árvore do cerrado brasileiro, a fim de descobrir novos inibidores de α -amilase. Esses inibidores representam promissora proteção para colheitas, onde por meio de engenharia genética, pode-se utilizar sua expressão transiente em sementes, dando a esta elevada resistência contra insetos-praga.

MATERIAL E MÉTODOS

Purificação dos inibidores de α -amilase

Sementes de baru (*D. alata*) foram submetidas à extração em solução de NaCl 0,15M e HCl 0,6M e centrifugadas à 5000 rpm por 30 minutos a 4°C. O extrato bruto foi então precipitado com sulfato de amônio (100%) e dialisado contra água destilada. Esta fração enriquecida foi aplicada a uma coluna de Red-Sepharose CL-6B, com o intuito de isolar proteínas extremamente básicas. A coluna foi equilibrada com tampão Tris-HCl 0,5M pH 7,0

contendo CaCl_2 5mM e as proteínas retidas na coluna foram eluídas com tampão Tris-HCl 0,5M pH 7,0 contendo NaCl 3,0M. Os picos foram monitorados a 280nm. O pico retido foi aplicado em HPLC de fase reversa, em uma coluna analítica (Vydac C-18TP 522). As proteínas retidas foram eluídas em gradiente linear de acetonitrila (0-100%) em TFA 0,1%.

Análises de massa molecular

Os picos obtidos por HPLC foram analisados por espectrometria de massa (MALDI-TOF) de acordo com Franco *et al.* (2000).

Extração das α -amilases e ensaios enzimáticos

Intestinos de larvas de coleópteros dissolvidos foram dissecados e dissolvidos em solução gelada de NaCl 0,15M, homogeneizadas e centrifugadas a 3,000 x g por 15 min a 4°C, para remoção das paredes do intestino e fragmentos celulares. Ensaio enzimático utilizando α -amilases extraídas de intestino de *C. maculatus* assim como de outros insetos-pestes como *A. grandis* e *A. obtectus* foram realizados. Para os ensaios, foi utilizado tampão acetato 0,05M pH 6.5 e amido 1% como substrato. A reação foi monitorada a 530nm utilizando ácido 3,5 dinitrosalicílico, de acordo com o método de Bernfeld (1955) com mínimas modificações.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A fração rica em inibidores de α -amilase de sementes de *D. alata* foi aplicada em coluna de Red-Sepharose (Figure 1A), gerando um pico retido e outro não retido. As proteínas retidas foram testadas contra α -amilases de *C. maculatus* (Figure 2A) sendo capazes de inibir 80% da atividade amilolítica. Resultado similar foi observado contra α -amilase de *A. grandis* (70%). O mesmo pico não mostrou atividade inibitória contra enzimas digestivas de *A. obtectus* bem como contra PPA (*porcine pancreatic α -amylase*). Por essa característica, o baru tem uma grande vantagem sobre outros inibidores de α -amilase descobertos, possuindo especificidade contra insetos, enquanto outros possuem atividade contra esses insetos e também contra enzimas digestivas de mamíferos (Franco *et al.*, 2000; Grossi-de-Sá *et al.*, 1997).

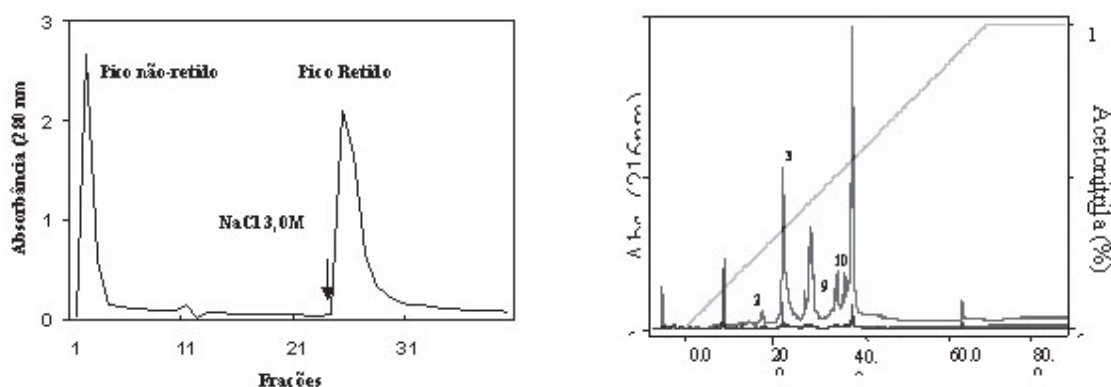


Figura 1. (A) Cromatografia de Red-Sepharose de fração rica precipitada com sulfato de amônio 100% de sementes de baru, mostrando o pico retido e o não retido. O pico não retido foi eluído com tampão Tris HCl 0,5M contendo CaCl_2 5mM em pH 7,0 e o retido foi eluído com tampão Tris-HCl contendo NaCl 3,0 M (seta preta). **(B)** HPLC de fase reversa de extrato de *D. alata*. A linha diagonal representa o gradiente de acetonitrila (0-100%). Foram observados 16 picos, dos quais quatro, numerados na figura, apresentaram inibição significativa. A linha diagonal representa o gradiente linear de 0-100%.

Análises em SDS-PAGE dos picos retidos das sementes de baru provenientes da Red-Sepharose (Figure 3A), apresentaram proteínas com massa molecular entre 5 a 80 kDa. O pico retido na Red-Sepharose foi em seguida aplicado em coluna de fase reversa de HPLC, originando em torno de 16 picos (Figura 1B). Todos os picos do HPLC foram testados contra *C. maculatus*, sendo destacados quatro picos que mostraram maiores taxas de inibição (picos 2, 3, 9 e 10) (Figura 2B). SDS-PAGE feito com os picos 2, 3, 9 e 10 mostraram proteínas de 6,0 kDa no pico 3, variando de 6 a 115.5 kDa nos demais picos (Figura 3B).

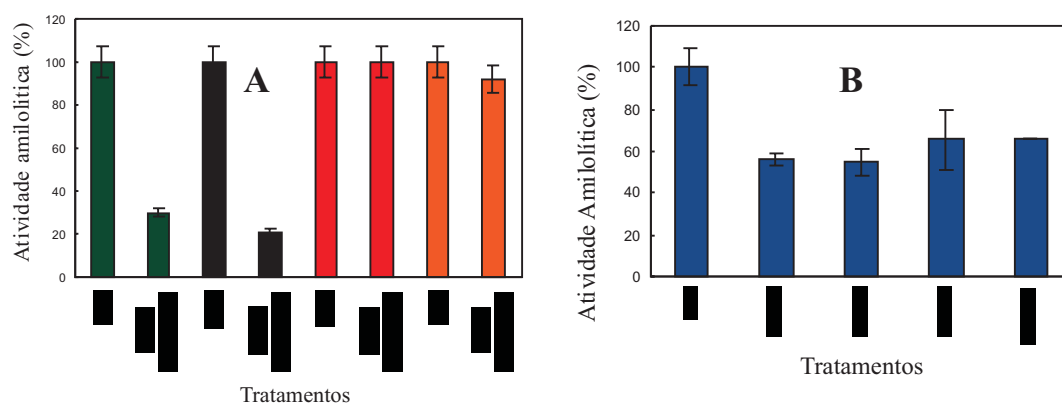


Figura 2. (A) Atividade inibitória do pico retido da cromatografia de Red-Sepharose extraído de *D. alata*, contra α -amilase de *A. grandis* (AgA), *C. maculatus* (CmA), PPA e *A. obtectus* (AoA). **(B)** Atividade inibitória dos picos provenientes do HPLC de fase reversa contra CMA.

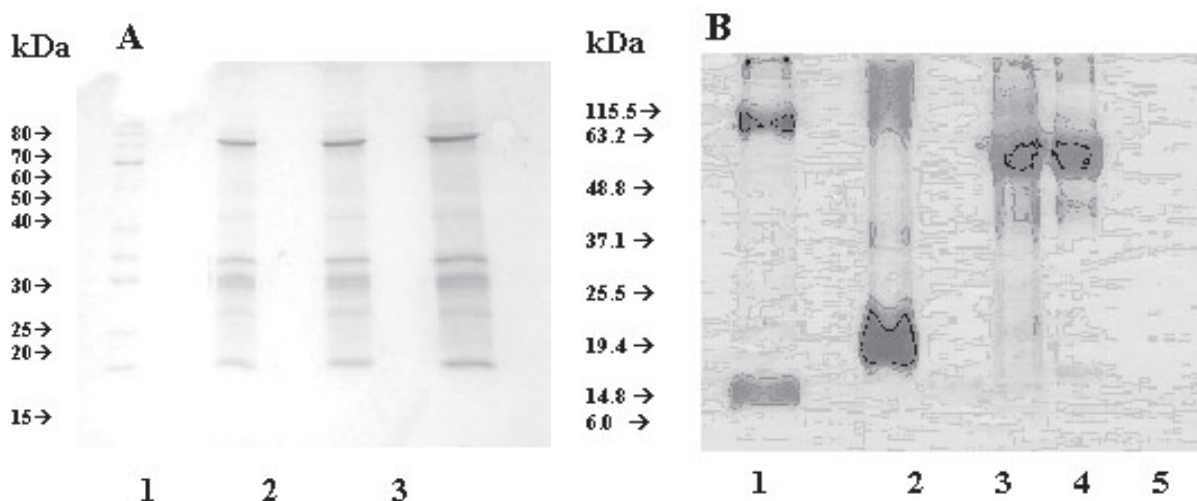


Figura 3. (A) Aplicação de pico retido de *D. alata* em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). A coluna 1 contém o marcador de peso molecular. As colunas 2, 3 e 4 contêm o pico retido da cromatografia de Red Sepharose. **(B)** Análise em SDS-PAGE dos picos 2, 3, 9 e 10 provenientes do HPLC. A coluna 1 contém o marcador, as coluna 2 - inibidor 2, 3 - inibidor 3, 4 - inibidor 9 e 5 - inibidor 10.

Análises em espectrometria de massa (MALDI-ToF) da fração 2 (Figure 4A), proveniente de HPLC de fase reversa, mostraram peptídeos majoritários de cerca de 11,0 kDa. Análises da fração 3 (Figura 4B) mostrou peptídeos de massa molecular entre 5000 e 6000 Da e da fração 10,0 (Figura 4C) apresentou peptídeos entre 10,0 e 20,0 KDa. Alguns inibidores caracterizados incluem proteínas com combinação da atividade contra enzimas de insetos e ineficácia contra enzimas de mamíferos, como mostrado nesses resultados (Franco *et al.*, 2002). Análises *in vitro* e de massa molecular mostraram ação específica contra α -amilase de insetos e também pode caracterizar um dos inibidores como uma proteína do grupo das tioninas, que são proteínas que geralmente apresentam ação inseticida e antimicrobiana (Block & Richardson, 1991). É notável o aparecimento de um crescente número de estudos tentando explicar os perfis de especificidade, buscando entender quais fatores estão envolvidos na interação da α -amilase de insetos e seus inibidores. Esses estudos podem ser usados, em um futuro próximo, para o *design* racional de bioinseticidas.

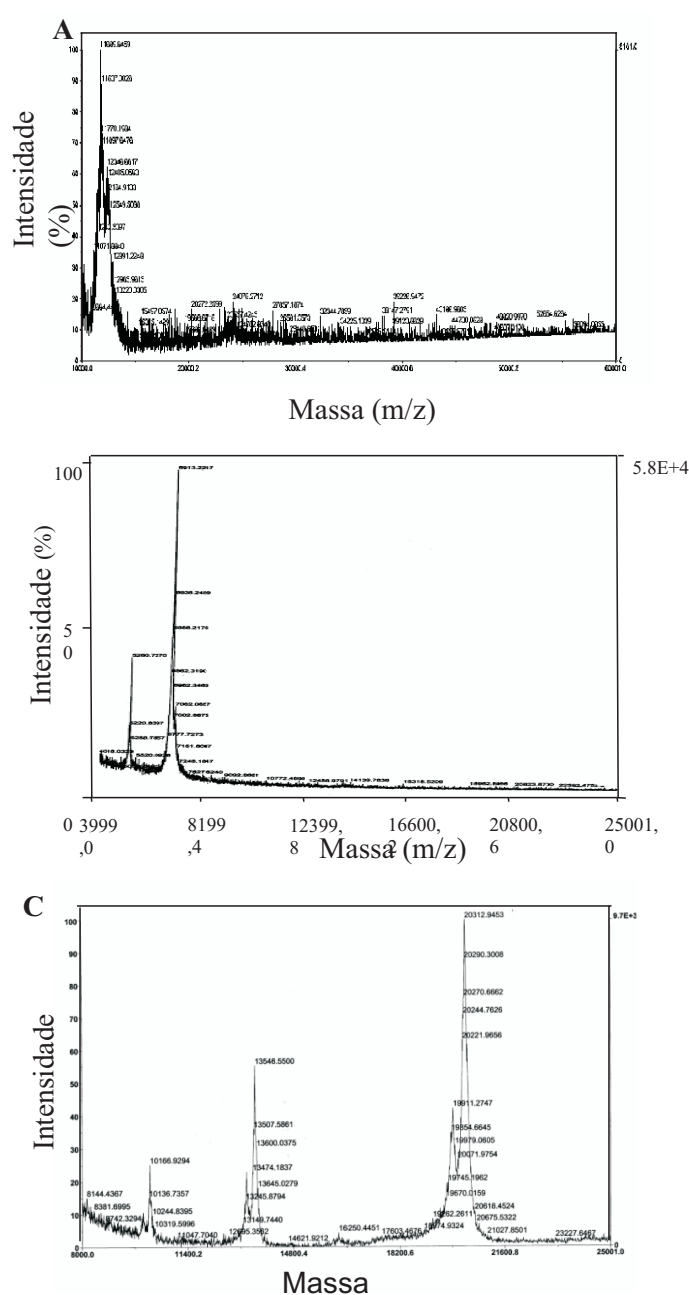


Figura 4. Análise de espectrometria de massa (MALDI (m/z) -ToF) da fração 2(A),3 (B) e 10(C) de HPLC.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERNFELD, P. Amylases α and β . **Methods Enzymology**, v.1, p.149-154, 1955.
- BLOCH JR, C. & RICHARDSON, M. A new family of small (5kD) protein inhibitors of insect α -amylase from seeds of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) have sequence homologies with wheat g-purothionins. **FEBS-Letters**, v.279, p. 101-104, 1991.
- FRANCO, O. L., RIGDEN, D. J.; MELO, F. R.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Plant α -amylase inhibitors and their interaction with insect α -amylases structure, function and potential for crop protection. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, n. 2, p. 397-412, 2002.
- FRANCO, O. L., RIGDEN, D. J., MELO, F. R., BLOCH JR, C., SILVA, C. P., GROSSI-DE-SÁ, M. F. Activity of wheat alpha-amylase inhibitors towards bruchid alpha-amylases and structural explanation of observed specificities. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n.8, p.2166-2173, 2000.
- FRANCO, O. L., MELO, F. R., MENDES, P. A., PAES, N. S., YOKOYAMA, M., COUTINHO, M. V., BLOCH, C. JR., GROSSI-DE-SÁ, M. F. Characterization of two *Acanthoscelides obtectus* α -amylases and their interaction with wheat inhibitors, **Journal of Agricultural and Food Chemistry In press**, 2004.
- GROSSI-DE-SÁ, M.F.; CHRISPPEELS, M.J. Molecular cloning of bruchid (*Zabrotes subfasciatus*) α -amylase cDNA and interactions of the expressed enzyme with bean amylase inhibitors. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 27, n. 4, p. 271- 281, 1997.
- MASATOSHI, F., MINAMI, Y., WATANABE, K., TADERA, K. Purification, characterization and sequencing of a novel type of antimicrobial peptides, *Fa-AMP1* and *Fa-AMP2*, from seeds of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench.). **Bioscience. And Biotechnology Biochemistry**, v. 67, n.8, p.1636-1642, 2003.
- SVENSSON, B., FUKUDA, K., NIELSEN, P. K., BONSAGER, B. C. Proteinaceous α -amylase inhibitors. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1696, p.145-156, 2004.

06 – ESTRATÉGIA MOLECULAR PARA RESISTÊNCIA A PRAGAS DE GRÃOS DE CEREIAS: CLONAGEM E EXPRESSÃO DA α -AMILASE DE *Rhyzopertha dominica*.

Mello, L.V.¹; Batista, J.A.N.¹; Redondo, A.C.C.²; Sousa, L.M.P.³; Castro, F.C.⁴; Findlay, J.B.C.² e Grossi-de-Sa, M.F.¹

¹ EMBRAPA - Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasil; ² Universidade de Leeds, Inglaterra; ³ Universidade de Brasília (UnB), Brasil; ⁴ CEUB, Brasil

RESUMO

Os bruquídeos de cereais causam grandes danos a agricultura mundial, atacando cereais em geral. Normalmente, os estudos são realizados em insetos específicos. No entanto, é de se esperar que o mecanismo de interação enzima-inibidor entre essas proteínas de outros insetos/plantas apresente grande semelhança. Desta forma, este trabalho poderá servir como base em novos estudos, procurando-se resolver outros problemas da agricultura. Assim, de uma forma mais ampla, o impacto se deverá a um avanço nos estudos de obtenção de plantas transgênicas resistentes a pragas, tendo como consequência uma queda na perda da produção de grãos. O cDNA do gene da α -amilase de *R. dominica* foi clonado, expresso em cultura de células de insetos com vetores de baculovírus, e demonstrado que o cDNA codifica para uma enzima ativa.

INTRODUÇÃO

A produção de grãos no Brasil vem crescendo nas últimas décadas, porém a produtividade vem decrescendo. Vários são os fatores que contribuem para este fato, desde sócio-econômico até fitossanitários e agro-ecológicos. As perdas na produção da agricultura mundial, devido ao ataque de pragas e doenças chegam a 37%, sendo que 13% desta perda é causada por insetos (Gatehouse e Gatehouse, 1998). Diferentes espécies de insetos causam grandes danos em muitas culturas, podendo ser observados desde a semeadura até a pós-colheita. Insetos se alimentam de diferentes partes da planta, desde a folha até as raízes, prejudicando assim tanto a produção como a qualidade do alimento colhido. Os danos podem ocorrer ao nível de campo, como ao nível de armazenagem, principal fator de perda de produção dos alimentos em forma de grão. Muitos produtores, principalmente os pequenos produtores, possuem uma fraca infra-estrutura de armazenagem, deixando os grãos muito susceptíveis ao ataque de pragas. Entretanto, as plantas possuem um certo grau de resistência a insetos e apenas um número limitado destes são hábeis a alimentarem-se de cada espécie, individualmente. Essa resistência inerente é baseada nos vários mecanismos de defesa, desenvolvidos pelas plantas durante a evolução.

Os coleópteros são de longe o grupo mais importante das pragas de armazenagem. *Rhyzopertha dominica* é considerada a pior praga que ataca cereais armazenados em nosso país, sendo classificada como uma praga primária por ser capaz de atacar grãos inteiros, intactos e aptos para a armazenagem. Uma forma de proteção dos grãos é o uso de produtos químicos, de forma a controlar a população de insetos. Uma outra tecnologia para manter a qualidade dos grãos durante seu armazenamento é o desenvolvimento de cereais recombinantes que possuíam proteínas ativas que impedem o crescimento de insetos, reduzindo a população das pestes. Proteínas bioativas, tais como inibidores de amilases são alvo de estudo visando proteção contra *R. dominica*. No entanto, existe uma certa especificidade dos inibidores em relação às enzimas (Ryan, 1990). Dados existentes mostram que a atividade deste inseto apresenta propriedades atípicas de inibição por inibidores conhecidos. Assim, é necessário um melhor conhecimento das bases moleculares das amilases, de forma a se obter controle desta praga. Para tal, este projeto visa o isolamento de um ou mais genes e expressão da α -amilase de *R. dominica* a ser utilizada em futuros experimentos de atividade contra diferentes inibidores, bem como para a determinação de sua estrutura.

MATERIAL E MÉTODOS

Clonagem da α -amilase de R. dominica

Com base no alinhamento de seqüências deduzidas de algumas amilases de insetos conhecidas, tais como, *Tribolium castaneum*, *Drosophila pseudobscura*, *Zabrotes subfasciatus* e *Acanthoscelides*, regiões conservadas entre essas seqüências foram identificadas. O RNA total isolado do intestino médio de larvas de bruquídeos de cereais foi transcrito com a transcriptase reversa (AMV-RT). Através de oligonucleotídeos desenhados, a partir dessas seqüências conservadas, fez-se a amplificação de uma região do cDNA através da técnica de RT-PCR. Novos oligonucleotídeos foram desenhados direcionados para o 5' e 3' do gene para amplificação do cDNA por RACE-PCR. O cDNA completo foi obtido através de um primer desenhado para a extremidade 5' do cDNA em combinação com o "Anchor Primer" do final 3'.

Expressão da α -amilase de R. dominica

O sistema de baculovírus foi utilizado para expressar o cDNA da proteína obtida. Os plasmídeos utilizados, pFastBac e pFastBac-Hb (Gibco) que contém o promotor da poliedrina seguido por uma região de múltiplos sítios de clonagem. O segundo vetor também possui uma calda de 6X histidina no N-terminal. As novas construções foram denominadas pFastAmy e pFastAmyl-His.

*Transformação em células DH10 (*E. coli*)*

Células DH10 α foram transformadas com os plasmídeos pFAST α -amylase inserindo o gene da α -amilase no DNA do bacmídeo. O protocolo foi o recomendado pelo manual da Invitrogen Bac-to-Bac. O resultado da transformação foi avaliado pelo índice de colônias brancas, contendo o bacmídeo recombinante.

Preparação do DNA do bacmídeo recombinante e análise por PCR

Colônias com fenótipo branco confirmado foram transferidas para cultura líquida de 5 ml contendo kanamicina, gentamicina e tetraciclina. O DNA do bacmídeo recombinante foi isolado de acordo com protocolo recomendado pela Invotrogen e analisado em gel de agarose. A fim de verificar a transposição do gene da α -amilase no DNA do bacmídeo, reação de PCR foi realizada usando-se os primers M13 para amplificação (sequência flanqueadora do mini-*att*Tn7 dentro da região *lacZ* α -complementation do bacmídeo).

Transfecção das células de inseto

As células de inseto da linhagem Sf9 (*Spodoptera frugiperda*), crescidas em meio Grace (Gibco) serão transfectadas com 2.5 mg do DNA viral Baculogold (PharMingen). As células serão incubadas com o complexo DNA-lipossomo por 5 horas, seguidas por adição de novo meio de cultura e crescidas por pelo menos 72 horas antes de coletar as partículas virais no sobrenadante. O sobrenadante será utilizado para novas infecções em células Sf9 e o lisado celular será analisado para a atividade enzimática.

Atividade enzimática da α -amilase de R. dominica

A atividade amilolítica da enzima foi analisada através de ensaio colorimétrico baseado no procedimento do ácido dinitrosalicílico (Bernfeld, 1955) e em zimograma baseado no procedimento de Campos *et al.* (1989) e Grossi de Sá e Chrispeels (1997). O experimento foi realizado em triplicata.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A figura 1A mostra o primeiro fragmento da α -amilase de *R. dominica* amplificado por RT-PCR, correspondente a 400pb. 1B ilustra dois clones finais selecionados de cada construção (sem e com a calda de histidina). O tamanho final corresponde ao gene da α -amilase (~1.6 Kb) adicionados dos plasmídeos de expressão.

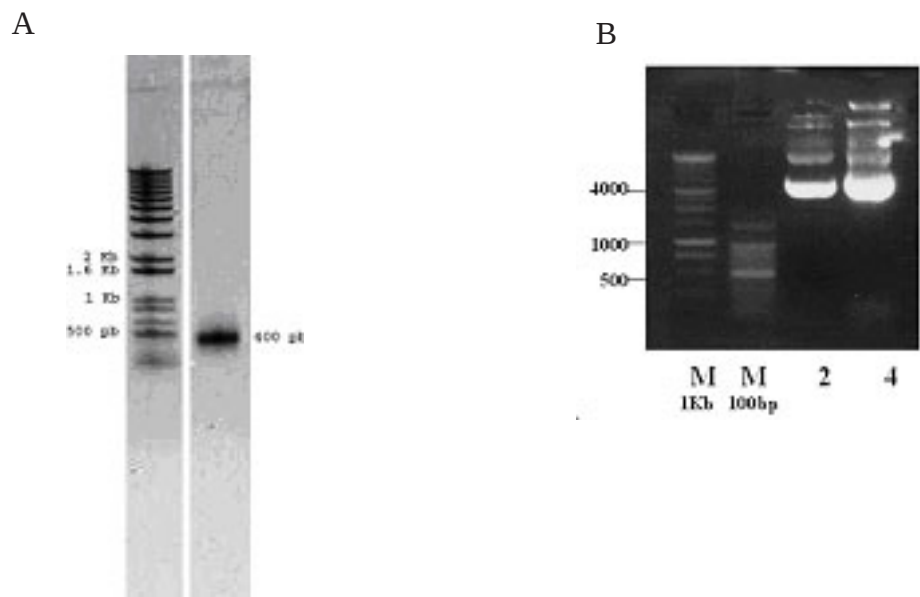


Figura 1: Análise do gene da α -amilase de *R. dominica* em gel de agarose
(A). Análise eletroforética em gel de agarose do produto de amplificação do 5' RACE. O fragmento foi amplificado utilizando-se os primers dT-AP e 5' RACE 3 e corresponde a 400 pb. (B). Análise do DNA dos clones pFAST-Amilase sequenciados: 2 e 4 corresponde aos clones de amylase RhyAmyl e RhyAmyl-His, respectivamente.

A figura 2 mostra o resultado da transposição do gene da α -amilase no DNA do bacmídeo, analisado por reação de PCR. O produto de PCR tem cerca de ~2300bp adicionado do tamanho do inserto (Bacmídeo com pFastbac-1) e ~2430bp adicionado do tamanho do inserto (Bacmid com pFastbac-Hb).

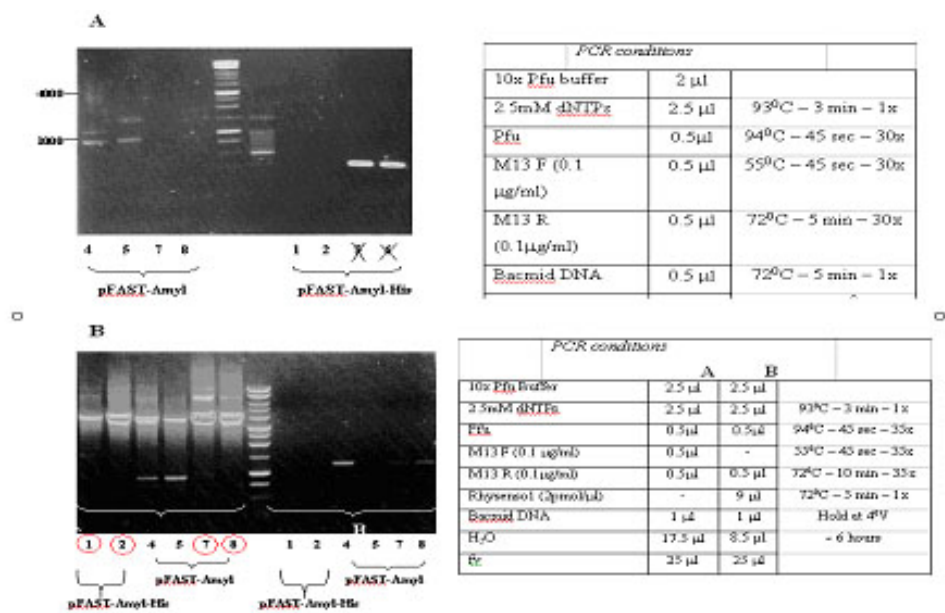


Figura 2. Análise por PCR do bacmídeo-DNA recombinante

O volume total das reações de PCR foi aplicada em gel de agarose 0,7%, corridor a 80V, por 1 hora e meia. A primeira condição de PCR (A) não produziu os resultados esperados e mostrou que as colonias 5 e 6 não correspondem a transposições eficientes, desde que o bacmídeo sozinho foi amplificado (~300bp). Em (B), o número de ciclos na reação de PCR foi aumentada, bem como o tempo de extensão, e testado com duas combinações de primers: M13 forward [5'-GTTTTCCAGTCACGAC-3'] e reverse [5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'] (A) ou Rhysenso1 (internal primer: 5'-TCAGTCACCATGAAGTTCCTG-3') e M13 reverse. No entanto, somente a primeira combinação produziu o resultado esperado. Bacmídeos recombinants mostram produto maior que 4000bp. Os DNAs dos minipreps 1 e 2 (pFast-Amyl-His) e 7 e 8 (pFast-Amyl) foram utilizados em subseqüentes experimentos de transfecção das células de inseto.

A proteína expressa de α -amilase foi analisada em gel de SDS 12%. Para a proteína da construção pFAST-Amyl, somente o extrato bruto proveniente da infecção em células de inseto foi avaliado. No entanto, para a construção pFAST-Amyl-His, avaliou-se tanto a extrato bruto como alíquotas da etapa de purificação em coluna de Ni-NTA (Figura 3).

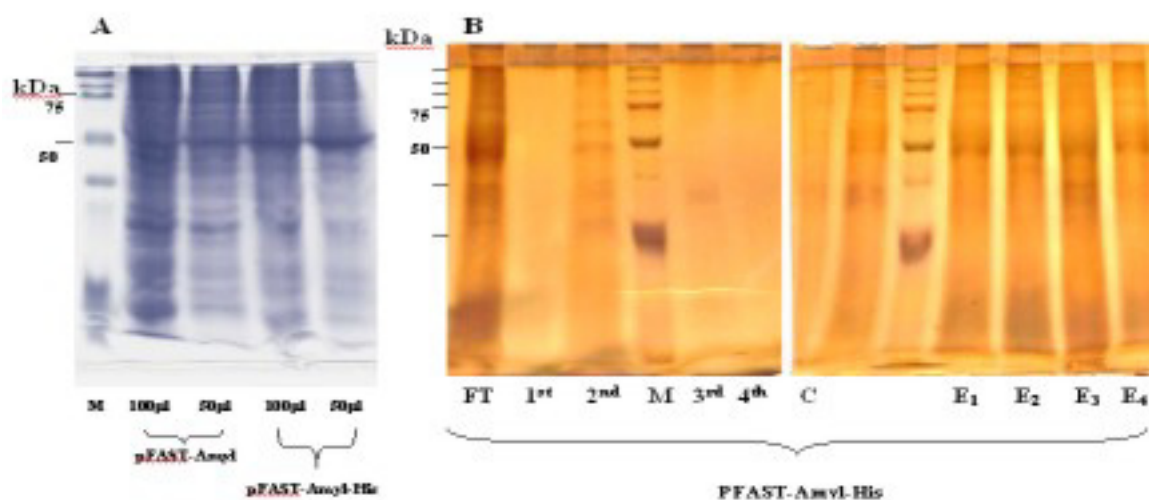


Figura 3: Análise da amilase recombinante de *R. dominica* em gel de SDS-PAGE

A. Precipitados celulares correspondentes a 50ml de células Sf9 infectadas foram misturados com 1x de tampão SDS-loading contendo β -mercaptoethanol e fevido por 2 minutos e aplicados em gel SDS 12%. **B.** extrato celular de 50ml de células Sf9 (infectadas com pFast-Amyl-his) foi pré-incubado com resina de Ni-NTA e vários passos da purificação foram aplicados no gel. FT- flowthrough, 1st-4th- lavagens com PBS, pH 7,4, E₁-E₄-eluição com 0,5M de imidazol em PBS pH4,7. C. extrato celular não infectado. M-BioRad Precision Plus marcador proteico. α -amilase recombinante corre em aproximadamente 50kDa.

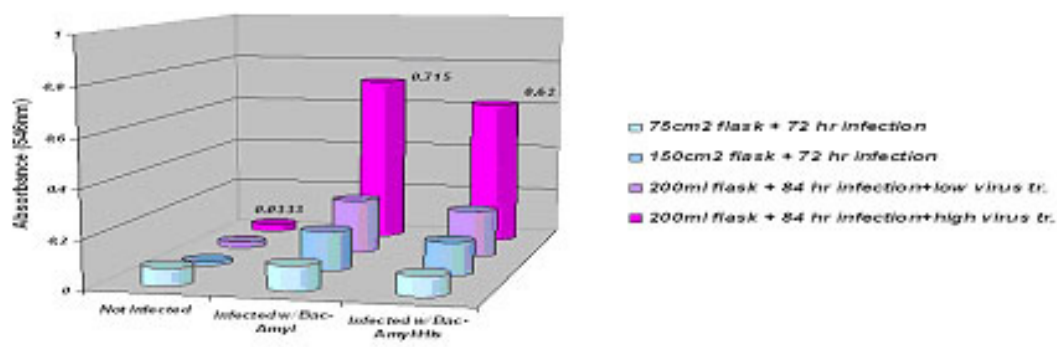


Figura 4. Ensaios bioquímicos para atividade enzimática

Análises foram realizadas com extratos de células de uma série de infecções em condições variadas, até a condição ideal ser obtida. Os valores máximos obtidos por células infectadas são após subtração da atividade amilolítica das células não infectadas. Os valores obtidos para o recombinante sem a presença da calda de histidina é ligeiramente maior, fenômeno este observado em todas as condições de crescimento/infecção.

PERSPECTIVAS

Futuros experimentos serão realizados relacionados com a especificidade da enzima com diferentes inibidores de α -amilase. Os resultados bioquímicos serão utilizados em estudos estruturais para melhor entendimento da interação enzima-inibidor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERNFELD, P. Amylases, α and β . In **Methods in Enzymology** (Edited by Colowick S.P. and Kaplan N.O.), Vol. 1. Academic Press, New York, 1995.
- CAMPOS F.A.P., XAVIER-FILHO J., SILVA C.P.; ARY M.B. Resolution and partial characterization of proteinases and α -amylases from midguts of larvae of the bruchid beetle *Callosobruchus maculatus* (F). **Comp. Biochem. Physiology**. 92B, 51-57, 1989.
- GATEHOUSE A.M.R.; GATEHOUSE J.A. Identifying proteins with insecticidal activity: use of encoding genes to produce insect-resistant transgenic crops. **Journal of Pesticide Science**. 52, 165-175, 1998.
- GROSSI DE SÁ, M.F.; CHRISPPEELS, M.J. Molecular cloning of bruchid (*Zabrotes subfasciatus*) alpha-amylase cDNA and interactions of the expressed enzyme with bean amylase inhibitors. **Insect Biochemical and Molecular Biology**, 27, 271–281, 1997.
- RYAN, C. A. Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, 28, 425–440, 1990.

07 - CARACTERIZAÇÃO DO GENE DA COLESTEROL OXIDASE COM VISTA AO CONTROLE DO BICUDO DO ALGODÃO VIA TRANSGENIA

Santos, R. C. ¹; Marcelino, L. H. ² e Gander, E. S. ²

¹ Embrapa Algodão, Campina Grande, PB; ² Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

RESUMO

O bicudo (*Anthonomus grandis* Bohmman, (1843), é responsável por perdas significativas na produção de algodão (*Gossypium hirsutum* L.). Uma alternativa ao controle através do uso de inseticidas químicos é a possibilidade de controle através da transgenia onde um gene codificante para uma proteína com efeito inseticida seria introduzido na planta de algodão conferindo resistência ao inseto. O gene que codifica para a colesterol oxidase (*choA*) representa um candidato para este fim e, como a alimentação do inseto adulto, assim como a oviposição e o desenvolvimento larval ocorre nos órgãos florais do algodão, seria desejável exprimir este gene nestes órgãos. O presente trabalho objetivou, em primeiro lugar, isolar e caracterizar genes do tipo *choA* a partir de estirpes nacionais de *Streptomyces*. Através de amplificações por PCR com primers específicos para o gene *choA*, um fragmento de 770 pb foi clonado a partir de duas espécies de *Streptomyces*, *S. somaliensis* e *S. sp-C7*, nativas das regiões Nordeste e Centro-Oeste brasileiros, respectivamente. Após análises de suas seqüências de nucleotídeos e aminoácidos, verificou-se que estes genes têm cerca de 80% de similaridade com os de *Streptomyces* depositados em bancos de dados. As diferenças observadas nas seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos indicam que tratar-se de novos genes. Em segundo lugar foi estabelecido um banco de cDNAs a partir de RNAs mensageiros presentes em anteras de algodão com a finalidade de utilizá-las, no futuro, para o isolamento de promotores antera-específicos.

INTRODUÇÃO

O bicudo, uma das principais pragas da cultura do algodoeiro, é responsável por perdas significativas na produção do algodão. Seu controle é feito através do uso de inseticidas químicos, o que onera bastante o custo de produção e provoca prejuízos ao meio ambiente. Uma possibilidade de controle é através da transgenia onde um gene codificante para uma proteína com efeito inseticida seria introduzida na planta de algodão conferindo resistência ao inseto. O gene que codifica para a colesterol oxidase (gene *choA*) representa um candidato para este fim. Colesterol oxidase é uma enzima produzida por alguns microrganismos e genes que codificam essa enzima tem sido isolado e caracterizado a partir de algumas espécies de *Streptomyces* (Ishizaki et al. 1989), *Brevibacteria* (Otha et al. 1991), *Rhodococls* (Navas et al. 2001), entre outras e fazem parte de um operon no qual um promotor regula a expressão dos genes estruturais cytochrome-*p450*-like (*choP*) e *choA* (Horii et al. 1990). A transcrição desse operon gera um transcrito de 2.9 Kb e durante a tradução são sintetizadas duas proteínas, *choP* com 381 aminoácidos e *choA* com aproximadamente 586 (Omura et al. 2001).

Os trabalhos de expressão heteróloga de *choA* em procariotos e eucariotos tiveram início na década de 90. Corbin et al. (1994) c expressaram o gene *choA* em *E. coli* e em protoplastos de plantas abrindo perspectiva para seu uso na engenharia genética vegetal. Em 2001 este grupo introduziu e expressou o gene no citosol e nos cloroplastos de plantas de tabaco e observou que as plantas expressando o gene *choA* apresentaram atividade inseticida contra larvas do bicudo do algodoeiro. Entretanto, as plantas que exibiram expressão citosólica apresentaram severas aberrações fenotípicas devido a atuação da colesterol oxidase com os fitosteróis, o que não ocorreu quando a proteína esteve compartimentalizada nos cloroplastos.

Algumas empresas ligadas à pesquisa agropecuária têm procurado isolá-lo uma vez que os já clonados, normalmente, fazem parte de processos de patente o que limita substancialmente seu uso no programa de melhoramento genético de cada instituição. Neste contexto, é interesse para o Brasil isolar seus próprios genes para utiliza-los posteriormente nos vários programas de biotecnologia envolvendo resistência a fitopatógenos.

Dentro deste conceito, o nosso trabalho focalizou :

1. na clonagem e caracterização do gene *choA* a partir de estirpes nacionais de *Streptomyces* e 2. no estabelecimento de um banco de cDNAs a partir de RNA mensageiros presentes em anteras de algodão, uma vez que o bicudo se alimenta destas estruturas e a oviposição, assim como o desenvolvimento larval ocorre dentro deles.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolamento do gene *choA*

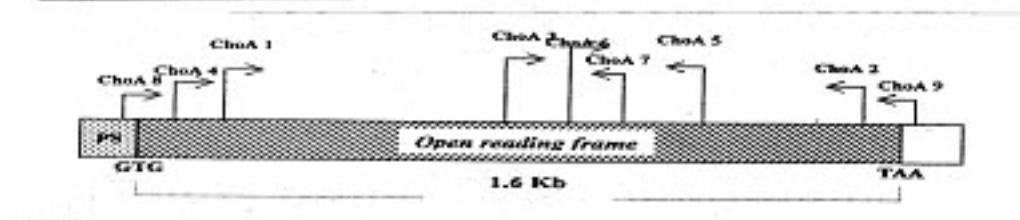
Isolamento do DNA

O DNA genômico de duas estirpes foi isolado a partir de culturas crescidas em meio líquido ISP₂ (extrato de levedura: 4%, maltose: 10%, dextrose: 4%) durante 72 horas a 37 °C com agitação. Os procedimentos de extração seguiram de acordo com os descritos por Brasileiro e Carneiro (1998) e Mariano (2000) com pequenos ajustes. Após crescimento, cada cultura bacteriana foi centrifugada 8000 x g/5 min e a seguir, tratadas com lisozima (0,6 mg/mL) e proteinase K (1,2 mg/mL) em 250 mL de tampão TEN (Tris: 10 mM, EDTA :10 mM, NaCl: 10 mM). O DNA foi precipitado com etanol puro e após centrifugação foi ressuspendido em água Milli-Q.

Amplificação de fragmentos via PCR

A partir de comparação de seqüências do gene *choA* de *Streptomyces*, *Brevibacterium*, *Rhodococcus* e *Nocardioideis*, primers da região consenso foram desenhados com auxílio do programa DNAMAN e são apresentados a seguir:

Primer	Seqüência de nucleotídeos (5'→3')	Tm ¹
ChoA 1	GGGCCAGCTGTGGAACCCAG	74,0
ChoA 2	CAGCGCCGTGATGGTCACGAA	74,7
ChoA 3	CACCGGCAAGGTCACCATC	71,9
ChoA 4	CGCGCTGCGCCTCGGCGA	78,2
ChoA 5	TGGTTGGCCCGGGCGGTCATG	78,6
ChoA 6	GAGTACTGCTTGGTCTCGA	67,6
ChoA 7	CCGACGACTTCACCTACCA	67,7
ChoA 8	ATGCTCGGCATGGCC GCCTT	74,4
ChoA 9	TTCCGGGATGGTGCGGTGA	71,9



As reações de PCR foram preparadas utilizando-se 0,2 mM de cada primer, 0,25 mM de cada dNTP, 0,05 mg de DNA de *Streptomyces*, 1 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), 1X do tampão da enzima (Invitrogen), 1,5 mM de MgCl₂ em um volume final de 50 µL. As condições de PCR utilizadas foram as descritas em Santos et al. (2003).

Southern blot-

Os produtos de PCR em gel de agarose foram transferidos para membrana Hybond-N-Nylon (Amersham Life Science[®]) através de Vacuum blotter (Bio-Rad) por 2 horas. A seguir

a membrana foi *cross-linked* com raios UV/ 30 seg. Um fragmento de *choA* de 280 pb, resultante de reação de PCR com DNA de *S.somaliensis*, foi usado como sonda e marcado com a P^{32} dCTP. Os procedimentos para Southern blot foram os descritos em Sambrook et al. (1989).

Clonagem e Sequenciamento

Os fragmentos amplificados, após purificação, foram clonados no vetor pGEMT-easy (Promega). O DNA dos transformantes foi purificado via lise alcalina de acordo com Sambrook et al. (1989). As seqüências de nucleotídeos foram determinadas em sequenciador automático (ABI Automated Sequencer). A análise das seqüências foi procedida com auxílio do programa DNAMAN (Lynnon BioSoft) e do programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) do National Center for Biotechnology Information- NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Análises de homologia

Seqüências da proteína *choA* depositadas no GenBank do NCBI foram selecionadas e analisadas comparativamente para verificação da similaridade entre as seqüências das estirpes estudadas neste trabalho. O alinhamento múltiplo realizado com o programa “Multiple sequence alignment” do DNAMAN (Lynnon Biosoft).

Modelagem molecular da proteína por homologia

As seqüências deduzidas de aminoácidos de ambas as espécies foram submetidas ao programa MODELLER 6.0 hospedado no servidor: “Structural Bioinformatics” (http://bioserv.cbs.cnrs.fr/HTLM_Bio/frame_meta.html). Para modelagem parcial da estrutura da proteína foram escolhidos moldes com 96% de identidade seqüencial. Utilizou-se ainda o programa “STING Millenium Suite”, da Embrapa para visualização e análise da seqüência da proteína (módulo “graphical contacts”).

Banco de cDNA de anteras

RNA total foi extraído utilizando-se a adaptação do método descrito por CHANG et al, (1993), a partir de anteras dessecadas de botões florais imaturos. Os RNAs poli(A⁺) foram isolados pelo método descrito no manual ‘Micro-Fast track 2.0 kit’ da Invitrogen. E as bibliotecas de cDNAs foram produzidas segundo o procedimento do manual de instruções ‘CREATOR SMART cDNA Library Construction kit’ da BD Biosciences. Os cDNAs foram inseridos no vetor pDNR-LIB da BD Biosciences e usados para transformar *Escherichia coli* XL1 Blue MRF’.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Clonagem e caracterização da seqüência parcial do gene choA

Fragmentos de 770 pb do gene que codifica para *choA*, obtidos a partir de amplificações de DNA, com os primers *choa3* e *choa2*, das duas espécies de *Streptomyces* são mostrados na Figura 1. Esta amplificação foi específica, gerando apenas o fragmento do tamanho esperado cuja especificidade foi também confirmada em *Southern blot*.

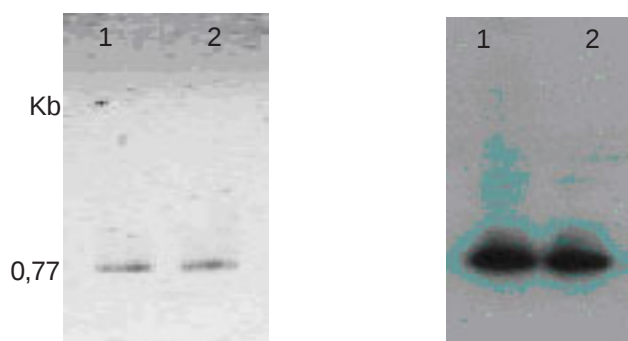


Figura 1. Produto de PCR em gel de agarose (0.8%) e respectiva autoradiografia obtida através de Southern blot. A) 1- *S. somaliensis*, 2- *S.sp-C7*. O asterisco indica o fragmento de 770 pb.

A seqüência nucleotídica do clone de *S. somaliensis*, bem como a seqüência de aminoácidos deduzida, são mostradas a seguir:

```

1      CACACCCTGGAGAAGGTCACCGGCATCAGCCGGGCGAGCGACGGCAGTTGGGTGCTGACC
1      H T L E K V T G I S R A S D G S W V L T

61     GCCGACCGCATCGACTACACCGGCGCGGTCGTCGAGACCAAGCAGTACTCCTGCACCTAT
21     A D R I D Y T G A V V E T K Q Y S C T Y

121    CTGTTCTCTCGGCGGCGGCAGCCTCGGCACCAGCGAACTCCTGCTGCGGTACGGCAGTCG
41     L F L G G G S L G T S E L L L R S R Q S

181    GGGACGCTCCCGGCGCTGGACGCGAGCGTCGCGCGGGCTGGGGACCCAACGGCAACACC
61     G T L P A L D A S V G A G W G P N G N T

241    ATGCTCGGGCGGGCCAACCACCTGTGGGACACCGTTGGGGCCAACCAGTCGACCATGCCG
81     M L G R A N H L W D T V G A N Q S T M P

301    GTCATGGGCATCGACGACTGGGCCAACACCGACAACCCCGTCTTCGCCGAGATCGCGCCT
101    V M G I D D W A N T D N P V F A E I A P

361    CTGCCCACGGGACTGGAGCACTGGGTGAGCCTGTACCTGGCCATCACCAAGAACCCGCAG
121    L P T G L E H W V S L Y L A I T K N P Q

421    CGCGCCAGATTCTCCTACGGCAGCGGGGGTTGAGCCTCGACTGGAGCGCCGCACAGAGC
141    R A R F S Y G S G G L S L D W S A A Q S

481    GCGGTCTCCTCCGGCATGACCAAGAAGCTCTTCGACCGGATCAACTCCGCCAACTCGACC
161    A V S S G M T K K L F D R I N S A N S T

541    ATCTACCGGTACGACCTCTTCGGCTCCCCGAGCCGGGTGTTTCGCCGACGACTTCACCTAC
181    I Y R Y D L F G S P S R V F A D D F T Y

601    CACCCGCTGGGTGGCTGCGTGCTGGGCAAGGCCACCGACAACCTACGGCCGGGTGAAGGGG
201    H P L G G C V L G K A T D N Y G R V K G

661    TATTCGAAGCTGTACGTCACCGACGGCTCACTGATCCCCGGCAACATCGGGGTGAACCCG
221    Y S K L Y V T D G S L I P G N I G V N P

```

As seqüências de nucleotídeos destes fragmentos bem como as proteínas delas deduzidas foram analisadas pelo programa Oligo Tech (version 1.00, Copyright 1995) e revelou 72% de similaridade entre essas duas espécies e alto conteúdo de GC, com média

de 67%, comum no genoma de algumas bactérias da classe Actinobacteria (Santos et al. 2003). Isto tem dificultado a clonagem inteira do gene a partir de PCR. Encontra-se em andamento o isolamento do gene completo a partir de biblioteca genômica.

A comparação entre as seqüências deduzidas das proteínas choA das duas espécies estudadas com as de outros microrganismos demonstrou várias regiões altamente conservadas, em particular, os aminoácidos do sítio ativo envolvidos na catalização enzimática. Esta similaridade entre as seqüências se reflete também na estrutura terciária das proteínas (Figura 2), teoricamente determinada a partir de uma comparação estrutural da choA de *S.sp* (ID: 1b4v) com as obtidas neste trabalho. Esta comparação foi possível devido a alta similaridade das proteínas de *S. somaliensis* e *S. sp-C7* (60%; E-value: 10^{-82} e 94%; E-value: 10^{-182} , respectivamente) com a de *S. sp* (1b4v) e a disponibilidade da estrutura no PDB (Protein Data Bank), com identidade fornecida pela análise das seqüências no BLASTp.

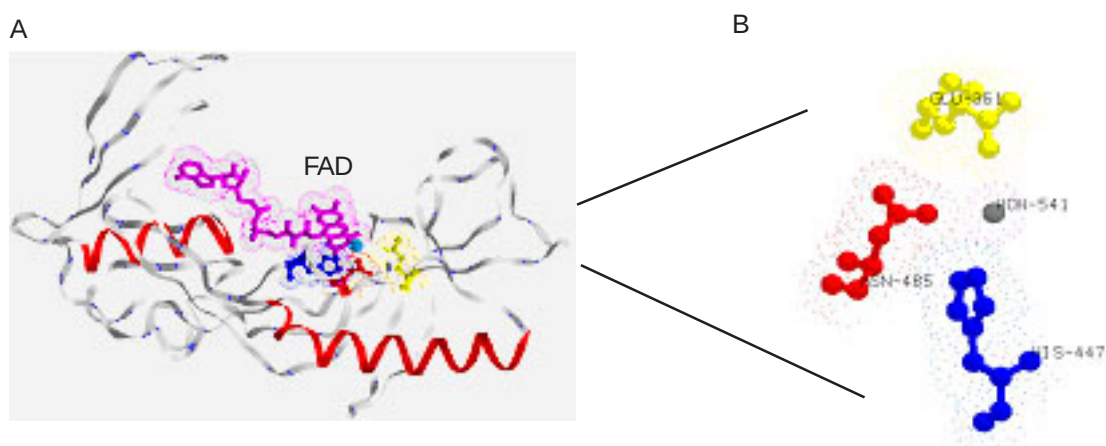


Figura 2. Estrutura da choA de *S. somaliensis* e *S. sp C7* mostrando o grupo prostético (FAD) e os sítios ativos da proteína (A). Um detalhe dos aminoácidos envolvidos no processo de isomerização (GLU), oxidação (HIS) e catalização (ASN) do colesterol é mostrado em B.

Para estimar o grau de similaridade entre as seqüências das proteínas de choA apresentadas depositadas em bancos de dados com as encontradas neste trabalho, construiu-se o dendrograma apresentado na Figura 3, utilizando-se o programa “Homology Tree” do DNAMAN. Verificou-se que as oito seqüências de choA foram distribuídas em três grupos, sendo o primeiro formado pelas proteínas de *Streptomyces*, o segundo pelas de *Brevibacterium* e *Rhodococcus* e o último, contendo apenas a proteína de *Gloeobacteria*. No grupo das *Streptomyces* observa-se ainda duas subdivisões, uma composta de *S. somaliensis* e *S. avermitilis* (NP826194), com 82% de similaridade e no outro, de *S. sp-C7*, *S. sp* (AAA69655) e *S. nataliensis* (CAC20926), com cerca de 84% de similaridade entre elas.

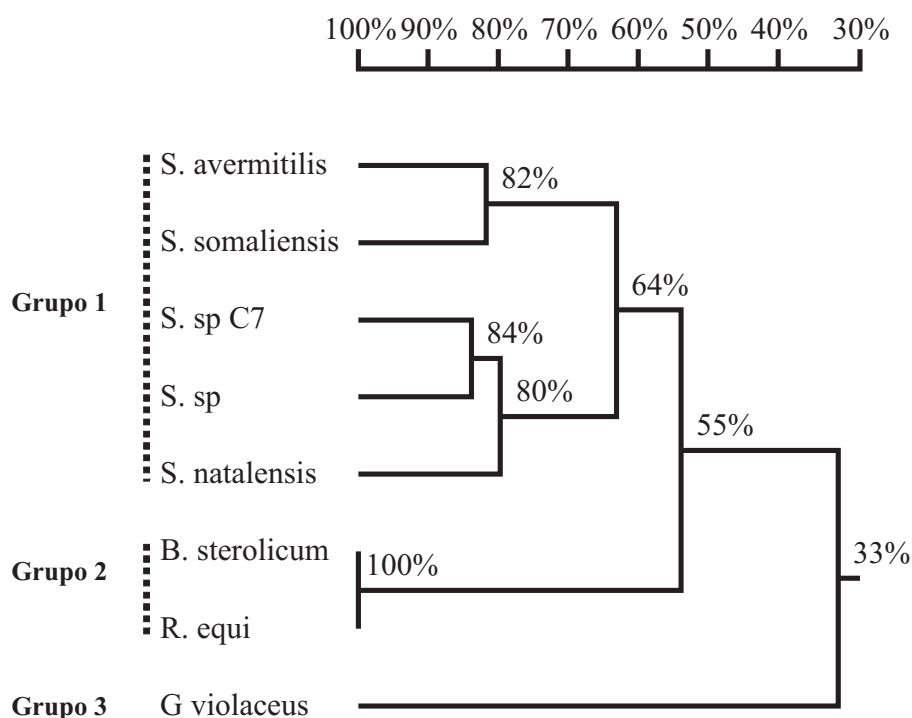


Figura 3. Dendrograma baseado na similaridade de seqüências da proteína choA de microorganismos depositadas em banco de genes, incluindo as seqüências parciais de *S. somaliensis* e *S. sp-C7* (setas) obtidas neste estudo.

2. Banco de cDNA de anteras de algodão

Foram obtidos aproximadamente 700 clones dos quais 96 foram seqüenciados, ate o momento.

Relatório da Análise de Redundância do grupo: Algodão

Total de placas : 1

Total de clones aceitos (TA) : 48

Total de clusters (TC) : 43

Total de singletons (TS) : 38

Percentagem de novidade : 88,37%

Percentagem de seqüências redundantes : 20,83%

Diagnóstico : O grupo ainda produz seqüências novas. Envie mais placas! 18-Nov-2004 *Página 1*

Esta análise de redundância se refere ao BLAST utilizando o banco de dados de seqüências de *Arabidopsis thaliana* do NCBI. Porém, comparações utilizando o banco de seqüências de plantas disponível no EBI (<http://www.ebi.ac.uk/>) revelam homologias com seqüências de genes de diversas espécies, alguns deles antera-específicos.

Exemplos:

Alignment	DB:ID	Source	Identity%	Ungapped%	Overlap	E()
1 ☒	EM_PL:AY351650	Gossypium hirsutum Anx1 (Anx	95.289	96.986	743	3.6e-162
2 ☒	EM_PL:GHU73747	Gossypium hirsutum annexin (An	82.930	84.862	703	7.5e-111
3 ☒	EM_PL:AF113545	Nicotiana tabacum vacuole-as	71.849	74.133	714	7.2e-79
4 ☒	EM_PL:CAN130956	Capsicum annum mRNA for an	71.935	73.233	677	1.3e-75

Alignment	DB:ID	Source	Identity%	Ungapped%	Overlap	E()
1 ☒	EM_PL:AC149494	Medicago truncatula clone mt	69.697	69.697	165	9.2e-10
2 ☒	EM_PL:AMFIL1G	A.majus fil1 gene for FIL1 prot	69.412	70.659	170	4e-09
3 ☒	EM_PL:LE108P	L.esculentum mRNA for 108 protei	66.860	69.277	172	2.4e-07
4 ☒	EM_PL:SLMEN8	S.latifolia mRNA for Men-8 prote	65.089	65.089	169	1.7e-06

PERSPECTIVAS

As seqüências das duas estirpes de *Streptomyces* reportadas nesse trabalho representam quase 50% do gene de *choA* e estendem a noção da alta variabilidade desses genes dentro do gênero. Isso pode representar uma diferença na atividade da enzima e conseqüentemente no seu potencial inseticida. Em termos de controle do bicudo, isto é relevante porque qualquer diferença em termos de toxicidade pode, em se tratando de plantas transgênica, oferecer uma maior proteção à planta. A clonagem da região 5' do gene esta em andamento. Quanto ao isolamento de promotores antera específico, temos alguns genes candidatos detectados na análise de seqüência dos clones do banco de cDNA, e a clonagem dos respectivos promotores será a próxima etapa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V. T. C. Manual de transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen, 1998. 309p.

HORII, M.; ISHIZAKI, T.; PAIK, S.Y.; MANOME, T.; MUROOKA, Y. An operon containing the genes for cholesterol oxidase and a cytochrome P-450-like protein from a *Streptomyces* sp. **Journal of Bacteriology**, v.172, n.7, p.3644-3653, 1990.

ISHIZAKI, T.; HIRAYAMA, N.; SHINKAWA, H.; NIMI, O.; MUROOKA, Y. Nucleotide sequence of the gene for cholesterol oxidase from a *Streptomyces* sp. **Journal of Bacteriology**. v.71, n.1, p.596-601, 1989.

MARIANO, R. L. R. 2000. Manual de práticas em fitobacteriologia. Recife:UFRPE, 171p.

NAVAS, J.; GONZALEZ-ZORN, B.; LADRON, N.; GARRIDO, P.; VAZQUEZ-BOLAND, J.A. Identification and mutagenesis by allelic exchange of *choE*, encoding a cholesterol oxidase from the intracellular pathogen *Rhodococcus equi*. **Journal of Bacteriology**, v.183, n.16, p.4796-4805, 2001.

OHTA, T.; FUJISHIRO, K.; YAMAGUCHI, K.; TAMURA, Y.; AISAKA, K.; UWAJIMA, T.; HASEGAWA, M. Sequence of gene *choB* encoding cholesterol oxidase of *Brevibacterium sterolicum*: comparison with *choA* of *Sreptomyces* sp. **Gene**, v.103, n.1, p. 93-96, 1991.

OMURA, S.; IKEDA, H.; ISHIKAWA, J.; HANAMOTO, A.; TAKAHASHI, C.; SHINOSE, M.; TAKAHASHI, Y.; HORIKAWA, H.; NAKAZAWA, H.; OSONOE, T.; KIKUCHI, H.; SHIBAI, T.; SAKAKI, Y.; HATTORI, M. Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: Deducing the ability of producing secondary metabolites. **Proceeding of the Nacional Academy of Science**, v.98, n.21, p.12215-12220, 2001.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: A laboratory manual. Harbor, NY : Cold Spring Harbor Lab., 1989.

SANTOS, R.C.; MARCELLINO, L.H.; GANDER, E.S. Partial cloning and characterization of a cholesterol oxidase gene from a Brazilian *Streptomyces* strain. In: 49 CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 49., 2003, Águas de Lindóia. (CD-ROM) Disponível em: <http://www.sbg.org.br/49Congresso/49Congresso.htm>)

08 – ISOLAMENTO DE GENES DE *Bacillus thuringiensis* COM POTENCIAL USO NO CONTROLE DAS PRAGAS DO ALGODOEIRO.

Magalhães, M.T.Q.^{1,2}; Batista, J.A.N.¹; Fragoso, R.R.^{1,3}; Silva, S.M.B.¹; Oliveira Neto, O.B.¹; Oliveira, G.R.¹; Figueira, E.L.Z.¹; Monnerat, R.G.¹; Ayub, M.A.Z.²; Soares, L.H.B.²; Carlini, C.R.R.S.² e Grossi de Sá, M.F.¹

¹Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF; ²Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS; ³Universidade de Brasília, Brasília, DF.

RESUMO

Bacillus thuringiensis (*Bt*) é uma bactéria Gram-positiva que, durante a esporulação, produz inclusões cristalinas, denominadas δ -endotoxinas, de ampla atividade inseticida, específicas para insetos de diferentes ordens e inofensivas a mamíferos. Esta característica vem sendo utilizada no desenvolvimento de plantas transgênicas capaz de controlar pragas de várias culturas de importância econômica. Dentre estas, pode-se destacar a cotonicultura que tem como uma das principais pragas o bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis*), um inseto de hábitos endofíticos, causador de grandes prejuízos econômicos. Neste contexto, foi caracterizada uma estirpe de *Bt*, do Banco de Germoplasma Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, com atividade tóxica contra o bicudo-do-algodoeiro. As análises bioquímicas e de microscopia eletrônica detectaram a presença de cristais quadrados, esféricos e bipiramidais e análise em SDS-PAGE mostrou proteínas de massa molecular de aproximadamente de 100 kDa, 68 kDa e 30 kDa. Utilizando-se oligonucleotídeos específicos para genes de diferentes classes e através da técnica de TAIL-PCR foram isolados três genes (*cry1Ab*, *cry1Ia12* e *cry8Ga*). O gene *cry8Ga* contém 2.688pb e codifica para uma proteína de 896 aminoácidos que apresenta 58% de identidade com outras toxinas Cry desta classe. As extremidades N e C-terminal são extremamente conservadas, enquanto que os três domínios estruturais (I, II, III), envolvidos na ligação com o receptor apresentam baixa identidade, confirmando a presença de uma nova toxina. O gene *cry1Ia12* contém 2.160pb e possui 100% de identidade e similaridade com os outros genes *cry1Ia*, já descritos na literatura. Os genes foram expressos em sistemas homólogo (*Bt* acristalífero) e heterólogo (*Escherichia coli*) e as proteínas recombinantes Cry8Ga e Cry1Ia12, de aproximadamente 100 kDa e 80 kDa, respectivamente, estão sendo avaliadas quanto a atividade inseticida sobre o desenvolvimento do bicudo-do-algodoeiro. Estas duas toxinas apresentam grande potencial para serem utilizadas em programas de engenharia genética no controle do bicudo-do-algodoeiro e outras pragas.

INTRODUÇÃO

A partir da década de 90 houve uma descentralização da produção de algodão, permitindo que o Brasil passasse de importador à exportador de fibras. Neste contexto, o algodão vem ganhando expressividade no cenário nacional com incrementos anuais significativos na área cultivada, produção, produtividade e qualidade. Na última safra (2003/04) a produção de algodão em pluma foi de 1,2 milhões de toneladas, representando aumento de 50,1% em relação à safra anterior, sendo os Estados do Mato Grosso, Bahia e Goiás, os maiores produtores (582,2; 262,4 e 166,7 mil toneladas, respectivamente) (CONAB, 2004).

Por ser uma cultura de grande importância sócio-econômica para os setores primários e secundários do Brasil, existe uma preocupação em tomar medidas eficientes contra os fatores limitantes de sua exploração. Dentre estes, podemos destacar os insetos-praga que constituem o fator limitante, gerador de gastos econômicos e perdas de produtividade. As principais pragas que atacam o algodão cultivado no cerrado são: as brocas (*Eutinobothrus brasiliensis* e *Conotrachelus denieri*), a lagarta rosca (*Agrotis* spp.), os pulgões, (*Aphis gossypii* e *Myzus persicae*), o tripés (*Frankliniella* spp.), o percevejo de

renda, (*Gargaphia torresi*), o curuquerê (*Alabama argillacea*), o bicudo (*Anthonomus grandis*), a lagarta-das-maçãs (*Heliothis virescens*), as lagartas do gênero *Spodoptera* (*S. frugiperda* e *S. eridania*), a lagarta rosada (*Pectinophora gossypiella*), os ácaros (*Tetranychus urticae*), os percevejos (*Horcias nobilellus* e *Dysdercus* spp.) e a mosca branca (*Bemisia tabaci*).

Dentre as mais severas podemos destacar *S. frugiperda* por se alimentar de folhas e *A. grandis*, um inseto fitófago de difícil controle que possui preferências alimentar e reprodutiva pelas estruturas frutíferas do algodoeiro (botões florais e frutos verdes). Assim, o bicudo utiliza dessas estruturas tanto para alimentação quanto para o desenvolvimento de suas fases imaturas (ovo, larva e pupa). Atingindo o estágio adulto, o inseto abandona o abrigo vegetal começando sua fase de vida livre.

A principal forma de controle do bicudo tem sido a utilização de produtos químicos o que exige grande investimento e ocasiona danos ao meio ambiente como desencadeamento de processos de resistência, ressurgimento de pragas, redução na incidência de inimigos naturais e problemas de poluição ambiental.

Diante desta problemática, a busca por alternativas biológicas como estratégias moleculares e a busca de genes de resistência vêm assumindo uma posição de destaque dentre as alternativas que visam o controle de insetos-praga.

Dentre as diferentes fontes de toxicidade para estes insetos, podemos destacar os agentes microbianos de ampla atividade entomopatogênica, denominados de *Bacillus thuringiensis*. A atividade inseticida desta bactéria é devida à produção de inclusões protéicas cristalinas durante a fase de esporulação, denominadas de d-endotoxinas. A maioria das estirpes de *B. thuringiensis* pode sintetizar mais de um tipo de cristal, podendo estar formados por distintas d-endotoxinas, relacionadas entre si, muitas das quais são tóxicas e específicas para certos insetos das ordens Lepidóptera, Díptera, Coleóptera, Hymenóptera, Homóptera, Orthóptera, não afetando insetos não-alvo, plantas, vertebrados ou o meio ambiente.

Quando o inseto susceptível ingere o *Bt*, as inclusões cristalinas são solubilizadas no intestino, em pH alcalino, ocorrendo a exposição das toxinas para sua ativação. As protoxinas são então processadas pelas proteinases do tipo tripsina liberando o fragmento tóxico. Após ativação, as toxinas Cry se ligam a sítios específicos, localizados nas microvilosidades das células colunares do intestino médio (BBMV). Logo após são observados sintomas como a parada alimentar, paralisia do intestino, vômito, diarreia, paralisia total e finalmente a morte.

Assim, a partir da identificação e caracterização de estirpes de *B. thuringiensis*, genes foram isolados, caracterizados, expressos e analisados contra as pragas do algodoeiro quanto ao potencial entomotóxico e posterior utilização em programas biotecnológicos destinados a obtenção de plantas transgênicas resistentes a insetos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Através de bioensaios seletivos, foi selecionada a estirpe S811, pertencente ao Banco de Germoplasma Microbiano da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, com base na sua toxicidade contra dois insetos-praga do algodoeiro (*A. grandis* e *S. frugiperda*).

A estirpe S811 de *B. thuringiensis* foi caracterizada genética, bioquímica e morfológicamente quando ao tipo de inclusões cristalinas existentes. Estas inclusões foram purificadas em gradiente de sacarose segundo o protocolo descrito por De Souza, *et al.* (1993). As suspensões de cristais foram observadas em microscópio eletrônico de varredura Zeiss modelo DSM 962.

As misturas esporos-cristais para análise das proteínas foram preparadas segundo protocolo descrito por De-Souza *et al.* (1993). Estas preparações foram analisadas por

eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida-SDS a 10% (SDS-PAGE), conforme procedimento descrito por Laemmli (1970).

A extração de DNA (CTAB) total foi realizada para obtenção de DNA com grau de pureza suficiente para amplificação por PCR. A técnica foi utilizada para identificação dos genes *cry* presentes nos isolados. As amplificações foram realizadas utilizando oligonucleotídeos específicos para detecção de genes do subgrupo *cry1* (Cerón et al., 1994 e 1995) e *cry8* (Bravo et al., 1998). Para a clonagem dos produtos de PCR, os fragmentos purificados foram ligados a um vetor comercial pGEM-T Easy (kit Promega) e os fragmentos clonados foram seqüenciados no Laboratório de Genoma Funcional em seqüenciador automático ABI-Prism. As seqüências obtidas dos clones foram comparadas com as seqüências do Banco de Dados (GeneBank) pelo programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). O alinhamento múltiplo das seqüências dos clones com as mais similares depositadas no Banco de Dados (GeneBank) foi feito pelo CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>).

Os genes foram expressos em sistema heterólogo *Escherichia coli* pET101/D-TOPO.

As proteínas recombinantes foram avaliadas em bioensaios seletivos contra larvas de bicudo-do-algodoeiro.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises de eletroforese demonstraram um perfil protéico com proteína majoritária de massa molecular de 100 kDa e outras duas de 68 kDa e 30 kDa, apresentando ponto isoelétrico (pI) entre 7,0 a 9,0 (dados não mostrados).

Os cristais purificados segundo o protocolo descrito por De Souza et al. (1993), foram utilizados na caracterização estrutural através de microscopia eletrônica de varredura onde se visualizou a imagem tridimensional de cristais quadrados, bipiramidais e esféricos (Figura 1).

O isolamento dos genes específicos por PCR (*Polimerase Chain Reaction*) com oligonucleotídeos iniciadores previamente descritos por Bravo et al. (1998) e Cerón et al. (1994 e 1995), permitiram a amplificação de quatro fragmentos iniciais codificadores de proteína Cry. Dois deles são fragmentos do mesmo gene (558 e 284 pb), apresentando 99% de identidade de seqüências de aminoácidos com proteínas da classe Cry1Ab. Os genes dessa classe foram os primeiros utilizados na transformação de plantas produtoras de toxina Cry (Barton et al., 1987). O segundo gene correspondente a classe *cry1I* também apresentou alta identidade e similaridade com outros genes da classe. Por apresentar grande potencial, este gene denominado *cry1Ia12* foi isolado para verificação de seu potencial inseticida contra o *A. grandis* e outras pragas do algodoeiro.

O terceiro gene foi inicialmente isolado por PCR (442 pb) utilizando-se os oligonucleotídeos específicos. Este gene mostrou 58% de identidade com as proteínas tóxicas da classe Cry8. Posteriormente, foram desenhados oligonucleotídeos específicos ao fragmento de 442 pb para clonagem do gene completo, utilizando a técnica de TAIL-PCR, que gerou um produto final com aproximadamente 2.600 pb.

Estes genes *cry8Ga* e *cry1Ia12* foram expressos em sistema heterólogo *E. coli* (Figura 2) e as proteínas recombinantes foram avaliadas em bioensaios seletivos (Figura 3) contra o bicudo-do-algodoeiro. Os resultados preliminares demonstraram a elevada taxa de mortalidade das larva, indicando alta toxicidade das toxinas Cry8Ga e Cry1Ia12 (Figura 4).

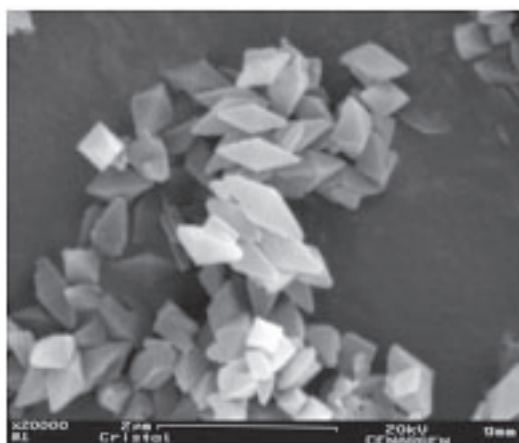


Figura 1. Microscopia eletrônica de varredura mostrando cristais presentes na estirpe S811.

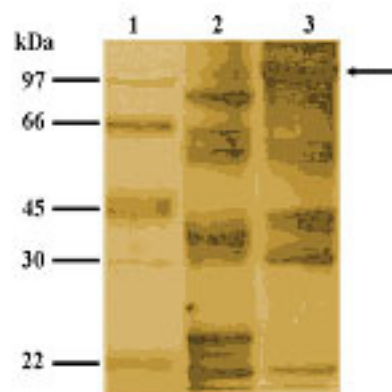
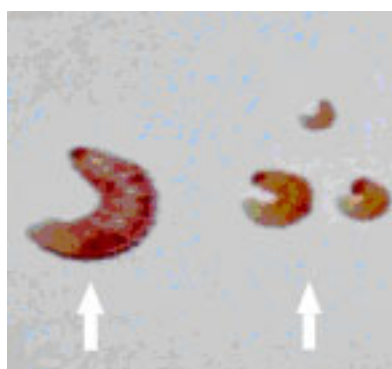
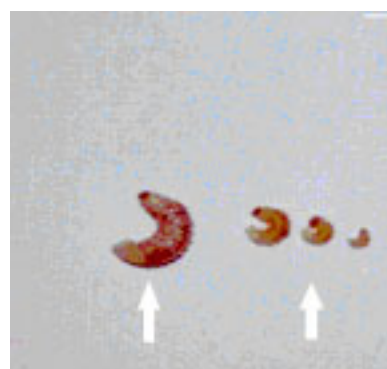


Figura 2. SDS-PAGE Cry8Ga. **1.** Marcadores de massa molecular. **2.** Extrato bruto não-retido pela resina IDA- Co^{2+} . **3.** Extrato retido pela resina IDA- Co^{2+} , sendo que a seta indica a proteína Cry8Ga.



Larva com desenvolvimento normal

Larvas com desenvolvimento alterado pela ingestão de toxinas Cry



Larva com desenvolvimento normal

Larvas com desenvolvimento alterado pela ingestão de toxinas Cry

Figura 3. Bioensaio de toxinas Cry contra larvas do bicudo do algodoeiro. **A.** Controle negativo, dieta do Bicudo + H_2O ; **B.** Desafio das larvas do bicudo contra a toxina Cry8Ga (100% de mortalidade); **C.** Desafio das larvas do bicudo contra a toxina Cry1Aa12 (50% de mortalidade); **D.** Larvas, do bicudo do algodoeiro, de diferentes tamanho, indica um grupo de larvas desafiadas com as toxinas Cry8Ga e Cry1Aa12, mostrando alteração no desenvolvimento das larvas.

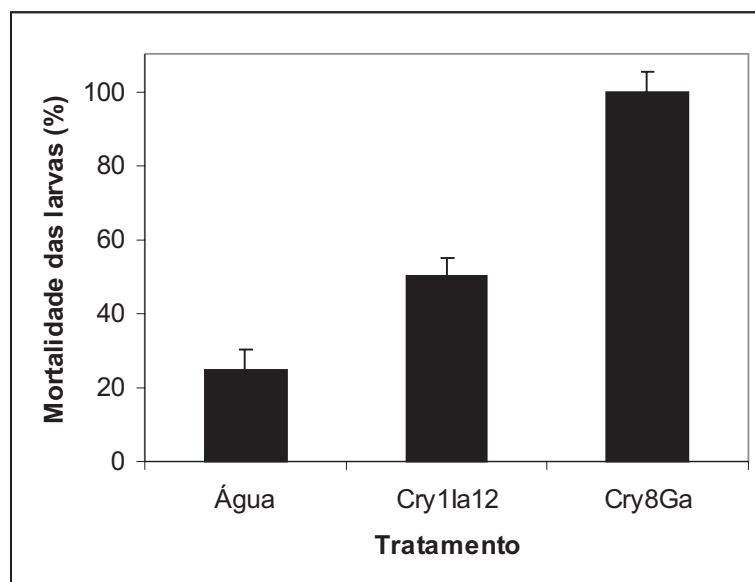


Figura 4.: Mortalidade de larvas do bicudo do algodoeiro desafiados com as toxinas Cry8Ga e Cry1Ia12.

PERSPECTIVAS

Estas toxinas estão sendo produzidas em bioreatores com o intuito de otimizar a expressão a qual ainda apresenta níveis muito baixos. As quantidades de proteína obtidas serão utilizadas em novos bioensaios, com pragas do algodoeiro e outras pragas, e em estudos de mecanismo de ação visando à busca de receptores no intestino dos insetos alvo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARTON, K. A.; WHITELEY, H.R. AND YANG, N. *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin expressed in transgenic *Nicotiana tabacum* provides resistance to lepidopteran insects. **Plant Physiology**, 85,1103-1109, 1987.
- BRAVO, A.; SARABIA, S.; LOPEZ, L.; ONTIVEROS, H.; ABARCA, C.; ORTIZ, A.; ORTIZ, M.; LINA, L.; VILLALOBOS, F.J.; PEÑA, G.; NUÑEZ-VALDEZ, M.E.; SOBERÓN, M. AND QUINTERO, R.. Characterization of *cry* genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied and Environmental Microbiology**, 64(12), 4965-4972, 1998.
- CERÓN, J.; COVARRUBIAS, L.; QUINTERO, R.; ORTIZ, A.; ORTIZ, M.; ARANDA, E.; LINA, L. AND BRAVO, A.. PCR analysis of the *cryI* insecticidal crystal family genes from *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, 60, 353-356, 1994.
- CERÓN, J.; ORTÍZ, A.; QUINTERO, R.; GÜERECA, L. AND BRAVO, A. Specific PCR primers directed to identify *cryI* and *cryIII* genes within a *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied and Environmental Microbiology**, 61, 3826-3831, 1995.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTOS-CONAB, disponível em <http://www.conab.gov.br>, acessado em 10/09/2004.
- DE-SOUZA, M.T.; LECADET, M.M. AND LERECLUS, D. Full expression of the *cryIIIA* toxin gene of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins. **Applied and Environmental Microbiology**, 175(10), 2952-2960, 1993.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** (London), 227, 680-685, 1970.

09 - SELEÇÃO DE TOXINAS CRY COM ALTA ESPECIFICIDADE E TOXICIDADE CONTRA O BICUDO DO ALGODOEIRO (*Anthonomus grandis*) E LAGARTA DO CARTUCHO DO MILHO (*Spodoptera frugiperda*).

Figueria, E.L.Z.¹; Brunetta, P.S.F.^{1,2}; Oliveira, G.R.¹; Cavalcanti, K.L.¹; Silva, M.C.M.¹ e Grossi-de-Sa, M.F.^{1,2}

¹EMBRAPA – Recursos Genéticos e Biotecnologia.; ²UCB – Universidade Católica de Brasília.

RESUMO

A cotonicultura brasileira ganhou expressividade no cenário nacional e internacional através da reorganização e mecanização do setor ocorrido no final dos anos 90 e pela qualidade da fibra produzida. No entanto, problemas relacionados ao ataque de pragas ainda constituem um dos principais fatores limitantes na produtividade e elevando substancialmente o custo de produção. Entre as pragas, as de hábito endofítica, representadas pelo bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis*) e lagarta do cartucho do milho (*Spodoptera frugiperda*), são as mais relevantes, infestando botões florais e maçãs que servem de fonte de alimentação e local de reprodução, causando perdas de produção e são de difícil controle, já que as estruturas do algodão as protegem dos inseticidas. Neste contexto, o presente trabalho teve por objetivo a seleção de genes com alta especificidade e toxicidade, contra estas pragas, a partir de uma biblioteca combinatória tipo *Phage Display* de genes *cry*. Os genes *cry3Aa* e *cry8Ga* foram submetidos à recombinação pela aplicação da técnica de evolução molecular *in vitro* (*DNA shuffling*) e os novos genes recombinados foram introduzidos no fagomídeo pCOMB3X, clonados em *Escherichia coli* XL1 Blue, obtendo uma biblioteca combinatória de genes *cry* mutantes com 10⁵ transformantes. Estes genes foram submetidos à seleção por *Phage Display* utilizando como ligantes receptores do intestino do bicudo do algodoeiro e receptores do intestino de *S. frugiperda*. Foram selecionados 21 genes para o bicudo e 16 para a lagarta do cartucho, os quais foram expressos em *E. coli* TOP10F'. Os mutantes estão sendo seqüenciados e sua atividade está sendo determinada em bioensaios contra as pragas-alvo.

INTRODUÇÃO

Após período de declínio no início dos anos 90, a cotonicultura se reorganizou com investimentos massivos em tecnologia agrícola e, atualmente, o país vem figurando internacionalmente como exportador de fibras, conquistando importantes mercados e vitórias comerciais recentes junto a Organização Mundial do Comércio referente aos subsídios desleais aplicados pela política agrícola dos Estados Unidos. No cenário nacional, o algodão vem ganhando expressividade com incrementos anuais significativos na área cultivada, produção (1,2 milhões de ton) e qualidade da fibra (CONAB, 2004).

Diante do êxito conquistado, todavia, o cultivo sofre grandes prejuízos com problemas remanescentes como ataque de insetos-praga, representados principalmente pelo bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis*), o curuquerê (*Alabama argilacea*), a lagarta da maçã (*Heliothis virescens*), a lagarta rosada (*Pectinophora gossypiella*) e a lagarta do cartucho do milho (*Spodoptera frugiperda*), entre outras. Entre as pragas, o bicudo do algodoeiro é considerado, atualmente, uma das mais relevantes da agricultura mundial, devido aos danos causados e dificuldades de controle. Apresenta ampla distribuição geográfica e nos últimos anos vem exercendo fortes pressões em Goiás, Minas Gerais, Bahia e Mato Grosso, causando grandes prejuízos. Além do bicudo, os problemas relacionados a lagarta do cartucho do milho, que se alimenta das folhas no seu estágio mais jovem e penetra nas maçãs e nos botões florais, causando grande destruição e dificultando o seu controle (NAKANO *et al.*, 1992). O controle do bicudo do algodoeiro e da lagarta do cartucho do milho pelos métodos convencionais com a aplicação de pesticidas é oneroso e ineficiente,

devido a fase larval do patógeno ser endofítica, além de ser prejudicial ao meio ambiente. Portanto o desenvolvimento de novas plantas resistentes poderia representar estratégias com perspectivas no controle destas e das outras pragas da cotonicultura. O setor, com marcante evolução, introduziu-se na era de plantas biotecnologicamente melhoradas contendo genes, capazes de expressar proteínas de defesa específicas a insetos-praga, dos quais se destacam as toxinas de *Bacillus thuringiensis* ou proteínas Cry.

Salienta-se que as toxinas Bt apresentam atividade específica e restrita a determinados insetos-praga, com a vantagem de apresentar inocuidade aos vertebrados, principalmente aos humanos, e ao meio ambiente (CRICKMORE *et al.*, 1998), fazendo deste agente um componente-chave nas estratégias de controle de pragas. O uso de técnicas moleculares na obtenção de toxinas melhoradas (*DNA shuffling*) e construção de biblioteca combinatória (*Phage display*) permitem o desenvolvimento de novas toxinas e selecioná-las com atividade extrita sobre o inseto alvo de interesse, sendo dessa forma, seguro quanto sua utilização em plantas geneticamente modificadas, protegendo o meio ambiente e mantendo o equilíbrio do ecossistema, além de apresentar-se inócuo aos humanos e aumentar a segurança de trabalhadores envolvidos no cultivo agrícola, devido a redução do uso de pesticidas.

O presente trabalho teve por objetivo a seleção de toxinas Bt (proteínas Cry) produzidas por *B. thuringiensis* no controle de pragas de hábito endofítica da cotonicultura, principalmente o *A. grandis* e a *S. frugiperda*, com ênfase ao uso de biblioteca combinatória de toxinas, construída, através das técnicas de *DNA shuffling* e *Phage display*, para seleção de mutantes contra as pragas alvo.

MATERIAL E MÉTODOS

Genes cry

Foram utilizados os genes: (i) *cry3Aa* (WU e DEAN, 1996) doados pelo Bacillus Genetic Stock Center-EUA e (ii) *cry8Ga* isolado previamente pelo grupo a partir *B. thuringiensis* (cepa 811) pertencente a coleção da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Criação do bicudo do algodoeiro

Os ovos foram espalhados em dieta artificial à base de extrato de algodão e as larvas ao eclodirem, se desenvolveram no interior desta dieta e quando os adultos emergiram, foram transferidos para uma gaiola, onde copulam e fazem ovoposição. Estes adultos foram alimentados com a mesma dieta. Os ovos são coletados, esterilizados e espalhados na dieta (MONNERAT *et al.*, 1999).

Criação da lagarta do cartucho do milho

Os ovos foram depositados em papel de filtro, esterilizados e colocados em dieta artificial, onde as lagartas se desenvolveram. Após a eclosão, as larvas se alimentaram da dieta e posteriormente completaram o ciclo larval, as pupas foram coletadas e colocadas em gaiolas onde copularam e ovopositaram no papel.

Obtenção de receptores de toxinas Cry do intestino do bicudo do algodoeiro e da lagarta do cartucho do milho

As proteínas periféricas do epitélio intestinal “Brush Border Membranes Vesicles” (BBMV) do bicudo do algodoeiro e lagarta do cartucho do milho foram extraídas segundo BIBER *et al.* (1981) e utilizadas na seleção de toxina Cry mutantes.

Construção de biblioteca combinatória de toxinas Bt e seleção de mutantes contra as pragas alvo

Na construção da biblioteca combinatória de genes codificadores para toxinas Bt, utilizou-se os genes *cry3Aa* e *cry8Ga*, sendo que no desenvolvimento da biblioteca combinatória utilizou-se as tecnologias de *DNA shuffling* (STEMMER 1994; ZHAO *et al.*, 1998; VOLKOV *et al.*, 2000; COCO *et al.*, 2001) e *Phage display* (SMITH, 1985).

Os genes parentais foram alinhados e comparados com outras seqüências, presentes em banco de dados a fim de definir a região codificadora da proteína ativa que contém os três domínios e desenhar oligonucleotídeos específicos para a amplificação das seqüências determinadas. Posteriormente, os genes foram submetidos à transformação através da tecnologia do *DNA shuffling*, que compreenderam as seguintes etapas: (i) amplificação dos parentais genes em reação de PCR com oligonucleotídeos específicos contendo o sítio de restrição para a enzima *SfiI*, (ii) fragmentação de 5 µg de cada um dos genes amplificados com a enzima *DNaseI*, cujos fragmentos obtidos apresentaram entre 30-50 pb, (iii) recombinação aleatória dos fragmentos em reação de PCR sem a adição de oligonucleotídeos e (iv) amplificação dos novos genes recombinados. Os novos genes foram digeridos com *SfiI*, introduzidos no fagomídeo pCOMB3X, clonados em *E. coli* XL1 Blue e estes genes foram submetidos a seleção por *Phage display* utilizando como ligantes receptores do intestino do bicudo do algodoeiro e lagarta do cartucho do milho. Os genes mutantes selecionados estão em processo de sequenciamento e expressão em *E. coli* TOP10F' a fim de utilizá-las na caracterização e realização de bioensaios, para posterior comparação com a atividade das proteínas originais.

Bioensaio utilizando as proteínas melhoradas

As toxinas Bt ou toxinas Bt melhoradas foram incorporadas na dieta artificial do bicudo do algodoeiro e da lagarta do cartucho do milho, determinando a mortalidade das larvas, cujos dados serão utilizados na determinação da DL_{50} , a fim de selecionar as toxinas mais ativas a serem aplicadas posteriormente em programas de melhoramento genético de algodão.

Sequenciamento dos genes selecionados

Os genes selecionados foram parcialmente seqüenciados em seqüenciador automático.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os genes *cry3Aa* e *cry8Ga* foram inicialmente amplificados (Figura 1B) e após fragmentação com *DNaseI* obteve-se fragmentos com 30 a 50 pb (Figura 1C). Estes fragmentos foram recombinados em reação de PCR sem a utilização de oligonucleotídeos e posteriormente utilizados como template para a recuperação dos novos genes recombinados em outra reação de PCR, utilizando oligonucleotídeos específicos (Figura 1D).

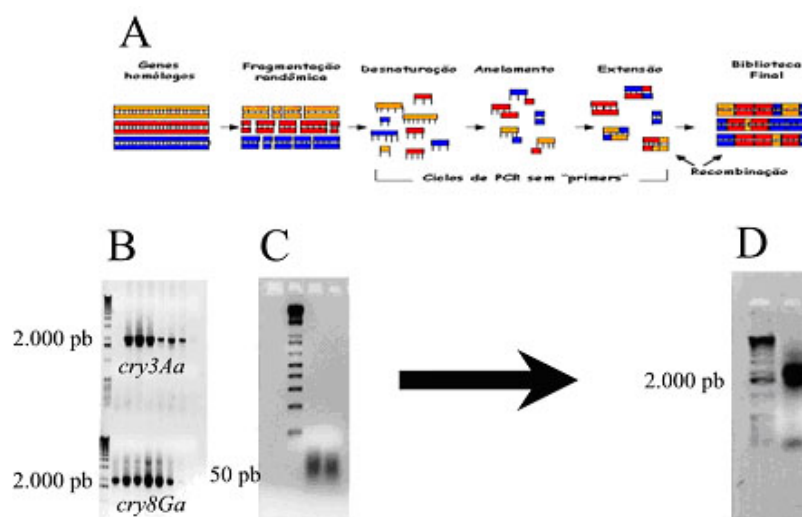


Figura 1: Obtenção de genes *cry* mutantes. **A.** Esquema geral da metodologia de *DNA shuffling* na obtenção de genes mutantes. **B.** Amplificação dos genes originais. **C.** Fragmentação dos genes originais com *DNaseI*. **D.** Amplificação dos genes mutantes.

Os genes mutantes foram introduzidos no fagomídeo pCOMB3X, clonados em *E. coli* XL1 Blue, obtendo uma biblioteca combinatória de genes *cry* mutantes com 10^5 transformantes. Estes genes foram submetidos à seleção por *Phage display* utilizando como ligantes as BBMV do intestino do bicudo do algodoeiro e/ou as BBMV do intestino de *S. frugiperda*. No momento selecionou-se aleatoriamente 21 genes *cry* mutantes para *A. grandis* e 16 para *S. frugiperda* após o terceiro e quarto ciclo de seleção, respectivamente. Salienta-se que os genes mutantes selecionados estão sendo expressos (Figura 2) para serem submetidos a bioensaios contra o bicudo do algodoeiro e a lagarta do cartucho do milho.



Figura 2: SDS-PAGE e *Western Blot* da expressão de diferentes genes mutantes em *E. coli* TOP 10F' após indução com 1 mM de IPTG.

A tecnologia do *DNA shuffling* vem sendo disseminada com sucesso no meio científico, e trata-se de uma ferramenta poderosa para a construção de bibliotecas combinatórias de genes mutantes, cujo produto resulta na geração de grande variedade de novos genes e permite a seleção das proteínas com características almejadas, segundo critérios, previamente estabelecidos. Em nível comercial, as enzimas são as mais susceptíveis de aplicação da tecnologia, melhorando as características intrínsecas e maior aplicabilidade na indústria (NEDWIN, 1997). O método, ainda permite desenvolver compostos inócuos aos humanos, aumentando a biossegurança alimentar e gerando novas proteínas distintas das existentes e patenteadas. Na agricultura, tecnologia do *DNA shuffling* permite o melhoramento de genes que poderão solucionar problemas específicos, tais como o

desenvolvimento de resistência a estresse biótico e/ou abiótico. Exemplos clássicos do emprego desta metodologia, na seleção de genes com características importantes, como atividade inseticida, já foram relatados no melhoramento de genes *cry*, onde LASSNER e BEDBROOK (2001) obtiveram uma biblioteca de genes *cry* que codificam toxinas Bt com incremento na atividade de até 3,8 vezes, quando comparados com os genes parenterais precursores da biblioteca combinatória.

Portanto espera-se ao final do trabalho obter genes *cry* melhorados que codificam para toxinas Bt com maior atividade e especificidade contra as pragas do algodoeiro, com enfoque ao bicudo do algodoeiro e a lagarta do cartucho do milho, a fim de aplicá-los no Programa de Melhoramento do Algodão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BIBER, J.; STIEGER, B.; HAASE, W.; MURER, H. A high yield preparation for rat kidney brush border membranes different behaviour of lysosomal markers. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.647, p.169-176, 1981.
- COCO, W.M.; LEVINSON, W.E.; CRIST, M.J.; HEKTOR, H.J.; DAZINS, A.; PEINKOS, P.T. *DNA shuffling* method for generating highly recombined genes and evolved enzymes. **Nature Biotechnology**, v.19, p.354-359, 2001.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTOS-CONAB, disponível em <http://www.conab.gov.br>, acessado em 10/09/2004.
- CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D.R.; FEITELSON, J.; SCHNEPF, E.; VANRIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; DEAN, D.H. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.62, p.807-813, 1998.
- LASSNER, M.; BEDBROOK, J. Directed molecular evolution in plant improvement. **Current Opinion in Plant Biology**, v.4, p.152-156, 2001.
- MONNERAT, R.G.; DIAS, S.C.; OLIVEIRANETO, O.B.; NOBRE, S.D.; SILVA-WERNECK, J.O.; GROSSI DE SÁ, M.F. Criação massa do bicudo do algodoeiro *Anthonomus grandis* em laboratório. **Comunicado Técnico/Embrapa**, v.46, p.1-4, 2000.
- NAKANO, O.; MARCHINI, L.C.; BATISTA, G.C. Pragas do algodoeiro, In: **Curso de entomologia aplicada à agricultura**. Piracicaba, ESALQ, 219-246. 1992.
- NEDWIN, G. E. Directed evolution of a fungal peroxidase. In: SAYLER, G. (Ed.). **Biotechnology in the sustainable environment**. New York: Plenum Press, 1997. p. 13-32.
- SMITH, G.P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. **Science**, v.228, p.1315-1317, 1985.
- STEMMER, W.P.C. *DNA shuffling* by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution. **Proceeding of the National and Academy Science of the United States of America**, v.91, p.10747-10751, 1994.
- VOLKOV, A.A.; SHAO, Z.; ARNOLD, F.H. Random chimeragenesis by heteroduplex recombination. **Methods Enzymology**, v.328, p.456-463, 2000.
- WU, S.-J.; DEAN, D.H. Functional significance of loops in the receptor binding domain of *Bacillus thuringiensis* CryIIIA α -endotoxin. **Journal of Molecular Biology**, v.255, p.628-640, 1996.
- ZHAO, H.; GIVER, L.; SHAO, Z.; AFFHOLTER, A.; ARNOLD, F.H. Molecular evolution by staggered extension process (StEP) in vitro recombination. **Nature Biotechnology**, v.16, p.258-261, 1998.

10 - LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR DE INSETOS - EMBRAPA ALGODÃO.

Lucena, W.¹; Vidal, M.¹; Miranda, J.¹; Belo, A.¹; Cesário, J.¹; Fabrício, W.¹; Djair, J.¹; Dantas, M.; Azevedo, I.¹; Patrícia, K.¹; Sousa, C.¹; Silva, P.¹ e Lyra, J.¹.

¹Embrapa Algodão, Campina Grande, PB.

RESUMO

A obtenção de ferramentas para o controle das pragas do algodão constitui a principal área de atuação do Laboratório de Biologia Molecular de Insetos (BMI) da Embrapa Algodão. Dentro deste contexto, duas linhas de pesquisa englobam projetos relacionados à seleção de entomopatógenos e genética de populações das principais espécies de insetos-praga. Duas cepas do *Bacillus thuringiensis* estão sendo estudadas para o controle da Lagarta Militar devida à alta atividade tóxica. Paralelamente, a variabilidade genética e a estrutura populacional das populações de *Anthonomus grandis* do Brasil estão sendo avaliadas quanto a sua possível correlação com a resistência aos inseticidas químicos e às diferentes pressões de seleção presentes nos diferentes sistemas de produção e ecossistemas.

INTRODUÇÃO

Oitenta por cento da cotonicultura mundial está concentrada nos países em desenvolvimento, com um consumo de cerca de 20 milhões de tonelada/ano de algodão em pluma, distribuídos em 150 países (Shelton, Zhao e Roush, 2002). Em 2004, safra recorde, a produção de algodão em pluma no Brasil alcançará, segundo as expectativas, 1,240 milhão de toneladas, 43% a mais que a safra do ano passado. A área cultivada também aumentou em cerca de 40%, passando de 735,1 mil hectares na safra 2002/2003, para 1,029 milhão de hectares. Apesar deste quadro promissor, a cotonicultura ainda enfrenta como principal entrave o controle de cinco espécies-praga das ordens Lepidoptera e Coleoptera: lagartas das maçãs (*Heliothis virescens*), lagarta rosada (*Pectinophora gossypiella*), duas espécies desfoliadoras (*Alabama argillacea* e *Spodoptera frugiperda*) e o bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis*), respectivamente. Os inseticidas utilizados contra o complexo de pragas que atacam o algodão correspondem a mais de dois terços da quantidade total de pesticidas empregados na cotonicultura.

Desta forma, duas ações podem elucidar algumas questões importantes para o conhecimento da biologia destas espécies, bem como para o seu controle: o diagnóstico e monitoramento da resistência aos inseticidas químicos empregados na cotonicultura e a descoberta de novas ferramentas de controle.

Para os estudos de resistência, é necessário um levantamento da estruturação genética das populações de insetos, seus possíveis refúgios e os principais eventos de pressão de seleção.

Paralelamente, entre os principais agentes de controle, a bactéria entomopatógena *B. thuringiensis* tem apresentado um grande acervo de genes que codificam para toxinas eficazes na diminuição dos níveis populacionais em campo.

MATERIAL E MÉTODOS

Para os estudos populacionais estão sendo realizadas, continuamente coletas de massas de ovos, lagartas, maçãs e botões florais de algodão dispostos no solo, nos diferentes estados produtores de algodão. O DNA total dos insetos é extraído utilizando o protocolo descrito por Ayres (2001).

As análises populacionais são realizadas utilizando marcadores de isoenzimas, RAPD, mtDNA, microssatélites e marcadores nucleares envolvidos com a diapausa. Para os experimentos de RAPD e microssatélites, os kits OPERON foram testados e os melhores primers selecionados. Sequências de microssatélites foram selecionadas do GENE BANK e os respectivos primers desenhados. Os protocolos para os demais marcadores são

executados de acordo com os descritos na literatura (Scataglini *et al.*, 2000; Ayres, 2001; Lewis *et al.*, 2002 e Martins *et al.*, 2003). A Análise das matrizes geradas foram realizadas no programa POPGENE (versão 1.32), que possibilitou a estimativa da diferenciação genética, identidade e distância.

Para a seleção das cepas foram coletadas amostras de solo da Região Metropolitana do Recife. A coleta, isolamento, cultivo e bioensaios segue o protocolo descrito por Amos (2000).

As cepas mais eficientes foram cultivadas em meio MBti durante 24 horas a 250 rpm. Para extração do DNA plasmidial foi utilizado o protocolo de extração de plasmídios da QIAGEN® (Alemanha), (QIAGEN® Plasmid Handbook, 1995), com algumas modificações. Para estas reações de PCR, foram utilizados primers (iniciadores) de genes *cry*, de acordo com Porcar *et al.* (2003).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Genética de Populações de Anthinomus grandis:

Foram utilizados 13 sistemas enzimáticos para avaliar as populações de *A. grandis*. A heterozigiosidade média observada nos *loci* polimórficos variou entre 0,274 e 0,173 e o polimorfismo variou entre 25 e 100%. Três *loci* não estavam em Equilíbrio de Hardy-Weinberg, Po-1 (Campina Grande), Idh-1 (Missão Velha) e Me-1 (Barbalha). A diferenciação geral entre as populações foi alta e correspondeu a um Fst de 0,544 e as distâncias genéticas variaram entre 1.656 (Barbalha/Primavera de Leste) e 0,078 (Campina Grande/Primavera do Leste). O fluxo gênico estimado (Nm), a partir do Fst total foi de 0,210.

Os três *primers* utilizados possibilitaram a identificação de 25 *loci*. A análise destes *loci* revelaram uma diferenciação genética elevada (Fst = 0,4753) e um baixo fluxo gênico entre as populações (Nm = 0,2760). Em relação à distância genética (fig. 4) foi observada a maior distância entre as populações de Itubiara (GO) e Barbalha (BA), correspondendo a 0,5246; enquanto, a menor distância genética encontrada (0,1959) ocorreu entre as populações de Campina Grande (PB) e Barbalha (CE).

Diferentes marcadores moleculares vêm sendo utilizados para compreender a estrutura genética e o fluxo gênico das populações naturais de *A. grandis* em países como Estados Unidos, Argentina e Brasil. Esses índices possibilitam o conhecimento do movimento de insetos entre as populações e a taxa de dispersão. Os vinte e cinco marcadores gerados pelos três *primers* revelaram uma alta diferenciação genética.

Os resultados da análise isoenzimática e RAPD demonstram uma alta diversidade genética, a qual poderá possivelmente interferir na resposta de uma estratégia de controle, comprometendo o sucesso do programa, uma vez que as populações poderão variar com relação às taxas de resistência e tolerância em resposta às diferentes pressões de seleção exercidas pelos inseticidas utilizados, dificultando desta forma, a elaboração de um programa de controle de escala mais abrangente. Por outro lado, o baixo fluxo gênico apresentado entre as populações possivelmente está influenciando a lenta dispersão de genes relacionados com os mecanismos de resistência aos pesticidas químicos, entre as populações.

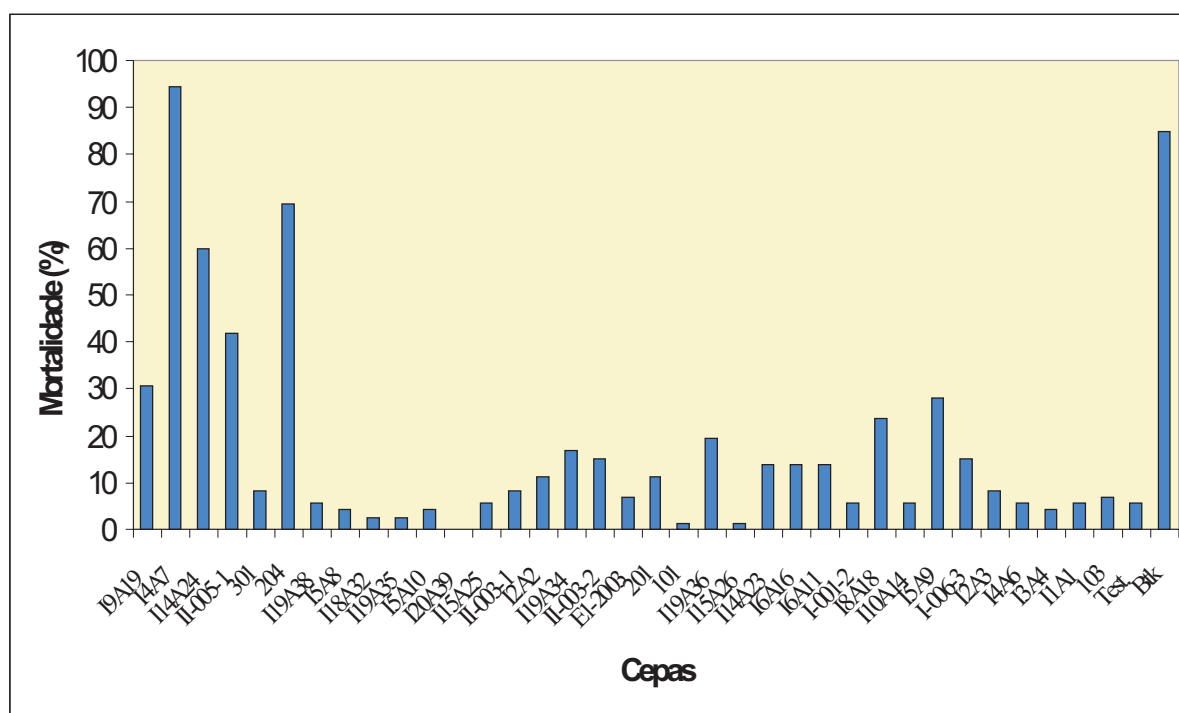
Avaliação de isolados de Bacillus thuringiensis:

Foram isoladas 24 cepas de *Bacillus* spp. a partir de 20 amostras. As cepas isoladas foram denominadas: I1A1, I2A2, I2A3, I3A4, I4A6, I4A7, I5A8, I5A9, I5A10, I6A11, I6A16,

I8A18, I9A19, I10A14, I14A23, I14A24, I15A25, I15A26, I19A32, I19A34, I19A35, I19A36, I19A38, e I20A39.

Levantamentos de cepas *B. thuringiensis* têm sido feitos em grande parte do mundo, pois sabe-se que o solo é uma grande fonte desta bactéria. Martin e Travers (1989) analisaram 1.115 amostras de solo obtidas em 30 países de todos os continentes, com exceção da Antártida, isolando 9.775 cepas desta bactéria. A partir destes resultados os autores afirmaram que o *B. thuringiensis* é uma bactéria que pode ser encontrada na quase totalidade dos ambientes do mundo. Já Chilcott e Wigley (1992) conseguiram isolar a partir de 338 amostras de solo 6.728 cepas de *B. thuringiensis* na Nova Zelândia. Posteriormente, Bernhard *et al.* (1997) isolaram 1326 cepas do solo, a partir de amostras de mais de 80 países, contemplando também todos os continentes com exceção da Antártida. No Brasil, um trabalho semelhante foi realizado, onde foram coletadas diferentes amostras de solo de diversos estados do país para isolar *B. thuringiensis* e avaliar a atividade destas cepas contra *S. frugiperda* (VALICENTE e BARRETO, 2003).

A mortalidade obtida pelas cepas isoladas a partir do solo e as cedidas pela empresa Bioticom (Dr^a Eugênia Rios) estão ilustradas no gráfico 1.



A seleção de cepas de Bt contra as lagarta é um processo contínuo que está sendo executado a medida que novas cepas autóctones estão sendo isoladas. No caso de *S. frugiperda*, as duas cepas escolhidas terão seus genes *cry* identificados e isolados a fim de serem utilizados na transformação do algodão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- SHELTON, A. M.; ZHAO, J.-Z. e ROUSH, R. T. Economic, Ecological, Food Safety, and Social Consequences of the Development of Bt Transgenic Plants. **Annual Review of Entomology**, v. 47. p.845-881. 2002.
- NAVON, A. Bioassays of *Bacillus thuringiensis* products used against agricultural pests In: **Bioassays of Entomopathogenic Microbes and Nematodes** (A.Navon and K.R.S. Ascher Eds.) CAB International, UK. p. 1-24, 2000.
- AYRES, C. F. J. **Genética de Populações de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus***. 89p. Tese de Doutorado. (Biologia Celular e Molecular/FIOCRUZ/PE), Recife, 2001.
- SCATAGLINI, M.A., CONFALONIERI, V.A. AND LANTERI, A.A. Dispersal of the cotton boll weevil (Coleoptera: Curculionidae) in South America: evidence of RAPD analysis. **Genetica**, v.108, p.127_136, 2000.
- LEWIS DK, SPURGEON D, SAPPINGTON TW, KEELEY LL. A hexamerin protein, AgSP-1, is associated with diapause in the boll weevil(1). **Journal Insect Physiology**, v.48, n.9, p.887-901, 2002.
- MARTINS, W. F. S. **Variabilidade Genética de Populações de *Anthonomus grandis* (Boheman, 1843)**. 33 p. Monografia de Graduação. Universidade Estadual da Paraíba, 2003.
- BERNHARD *et al.* Natural isolates of *Bacillus thuringiensis*: worldwide distribution, characterization, and activity against insect pests. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 70, p. 59-68, 1997.
- PORCAR, M.; JUARÉZ-PÉREZ, V. PCR-based identification of *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal genes. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, p. 419-432, 2003.
- VALICENTE, F. H.; BARRETO, M; R. *Bacillus thuringiensis* survey in Brazil: geographical distribution and insecticidal activity against *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH) (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology**. v. 32, n. 4, p. 639-644, 2003.
- CHILCOTT, C. N.; WIGLEY, P. J. Isolation and toxicity of *Bacillus thuringiensis* from soil and insect habitats in New Zealand. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 61, p. 244-247, 1993.

11 - CLONAGEM DO GENE *cry8Ga* DE *Bacillus thuringiensis* E CONSTRUÇÃO DE UM GENE SINTÉTICO PARA EXPRESSÃO EM PLANTAS DE ALGODÃO

Batista, J.A.N.¹; Magalhães, M.T.Q.^{1,2} e Grossi de Sá, M.F.¹

¹EMBRAPA – Recursos Genéticos e Biotecnologia; ² Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo clonar genes *cry* da estirpe 811 de *Bacillus thuringiensis*, que apresenta atividade contra o bicudo do algodoeiro, e proceder às modificações na sequência nucleotídica dos genes isolados de modo a otimizar a sua expressão em plantas de algodão transformadas. Amplificações iniciais foram feitas por PCR utilizando DNA total e primers específicos para a família *cry8*, seguido de duas rodadas de amplificação por Tail-PCR. No total foram amplificados 2.688 pb, codificando uma nova d-endotoxina de 896 aminoácidos denominada Cry8Ga, com 49-53% de identidade com outras d-endotoxinas Cry8. O fragmento amplificado compreende os três domínios estruturais característicos da extremidade N-terminal ativada das d-endotoxinas e mais 240 aminoácidos da extremidade C-terminal. No desenho do gene *cry8Ga* sintético foi incluindo a parte N-terminal da proteína e os três domínios estruturais responsáveis pela atividade inseticida. No total foram modificados 262 pares de base, resultando na eliminação de 25 sítios putativos de poliadenilação, 17 motivos de instabilidade ATTTA, 95 códons raros em plantas e no aumento do conteúdo de G-C de 35.6 para 43.8%. Todavia, as sequências protéicas do gene *cry8Ga* original e do gene sintético são idênticas. Como próximo passo o gene *cry8Ga* sintético será utilizado para transformar plantas de algodão visando a obtenção de cultivares com resistência ao bicudo.

INTRODUÇÃO

Dados do “IPM Working for Development” mostram que quase 25% dos pesticidas utilizados pela humanidade são gastos na cotonicultura. O controle de pragas como o bicudo do algodoeiro, *Anthonomus grandis*, e a lagarta do cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda*, com defensivos químicos é particularmente difícil devido ao seu hábito endofítico. A identificação de fatores com atividade sobre praga, tais como toxinas de *Bacillus thuringiensis*, é uma estratégia que vem sendo cada vez mais utilizada no desenvolvimento de cultivares resistentes.

Plantas de algodão expressando toxinas Cry (Bollgard™ da Monsanto) para o controle de lepidópteros, já foram desenvolvidas (Perlak *et al.*, 1990) e vêm sendo comercializadas desde 1996 (Jouanin *et al.*, 1998). Todavia, inexistente ainda hoje uma cultivar de algodão geneticamente modificada com resistência ao bicudo. Além disso, a questão de Propriedade Intelectual, aliada a uma crescente conscientização da sociedade contra o uso indiscriminado de agrotóxicos e a preservação do meio ambiente, antevêem um cenário onde plantas geneticamente modificadas serão, em curto prazo, fortes competidores dos cultivares nacionais.

Com o objetivo de desenvolver cultivares nacionais resistentes ao bicudo e outras pragas do algodoeiro, este trabalho está inserido em um projeto maior que tem como objetivo principal o controle das pragas do algodoeiro de hábito alimentar endofítico, através do isolamento de genes codificadores de proteínas com atividade e especificidade para as pragas *A. grandis* e *S. frugiperda*, e a transformação de algodão com estes genes. Especificamente, foi isolado um gene codificador de uma nova endotoxina Cry8 e realizadas

as modificações na sequência do gene de modo a otimizar a sua expressão em plantas transformadas de algodão.

MATERIAL E MÉTODOS

Clonagem do gene cry8Ga

A amplificação inicial do gene *cry8Ga* foi feita por PCR utilizando-se DNA total da estirpe 811 de *Bacillus thuringiensis* e os 'primers' Cry8b (Bravo *et al.*, 1998), específicos para a família *cry8*. Para obter a sequência completa do gene foram feitas duas rodadas de amplificação por Thermal Asymmetric Interlaced PCR - Tail-PCR (Liu e Whittier 1995), utilizando em cada uma seqüências derivadas das amplificações anteriores. Em cada Tail-PCR foram feitas três reações seqüenciais de PCR utilizando usando "primers" específicos derivados das seqüências previamente amplificadas e oito "primers" arbitrários. Fragmentos amplificados potencialmente positivos foram clonados no vetor pGEMT-easy e seqüenciados em ambas as direções em um seqüenciador automático. A análise das seqüências foi feita utilizando o pacote do programas do GCG (Genetics Computer Group, Inc.), recursos de bioinformática da página do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e o 'website' EBI (<http://www.ebi.ac.uk/>).

Construção de um gene sintético cry8Ga

Para modificar a sequência do gene *cry8Ga* está sendo utilizada a metodologia 'template directed ligation-PCR' – TDL-PCR, descrita por Strizhov *et al.* (1996). Resumidamente, o processo consiste das seguintes etapas: (1) Análise da sequência e síntese química dos oligonucleotídeos com as modificações a serem introduzidas; (2) Produção de DNA fita simples, da sequência do gene, e que será utilizado como molde na etapa subsequente; (3) Anelamento dos oligonucleotídeos com o DNA molde fita simples, parcialmente complementar, derivado do gene original, e ligação dos oligos utilizando uma DNA ligase; (4) Amplificação seletiva e síntese da segunda fita do DNA sintético por PCR, com oligonucleotídeos complementares apenas ao DNA sintético; (5) Montagem do gene, subclonagem e sequenciamento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Clonagem e caracterização do gene cry8Ga

A amplificação inicial por PCR com oligonucleotídeos específicos para a família Cry8 (Fig. 1A) resultou em um fragmento de 442 pb correspondente à extremidade 5' de um gene novo da família *cry8* (Magalhães *et al.*, 2001). Amplificações subsequentes com o objetivo de obter a sequência completa do gene, feitas por Tail-PCR (Figs. 1B e 1C), resultaram na amplificação de 2.688 pb (Fig. 2), que codificam uma endotoxina de 896 aminoácidos denominada Cry8Ga (Batista *et al.*, 2003). A maior similaridade é observada com o gene *cry8Aa* (53% identidade e 67% similaridade), seguido dos genes *cry8Ba* (53% identidade e 66% similaridade) e *cry8Ca* (49% identidade e 65% similaridade) (Fig. 3).

A sequência protéica predita do gene *cry8Ga* apresenta os três domínios estruturais característicos da extremidade N-terminal ativada das d-endotoxinas e mais 240 aminoácidos da extensão C-terminal. Comparação com outras proteínas da família Cry8 revelou que ainda faltam cerca de 260 aminoácidos da extremidade C-terminal da proteína (Fig. 4).

As extremidades N-terminal e C-terminal da d-endotoxina Cry8Ga apresentam alta identidade com outras d-endotoxinas Cry8, enquanto os três domínios estruturais são menos conservados, particularmente o segundo e terceiro domínios, que estão envolvidos na ligação ao receptor, sugerindo novas atividades/especificidades inseticidas para o gene isolado (Tab. 1).

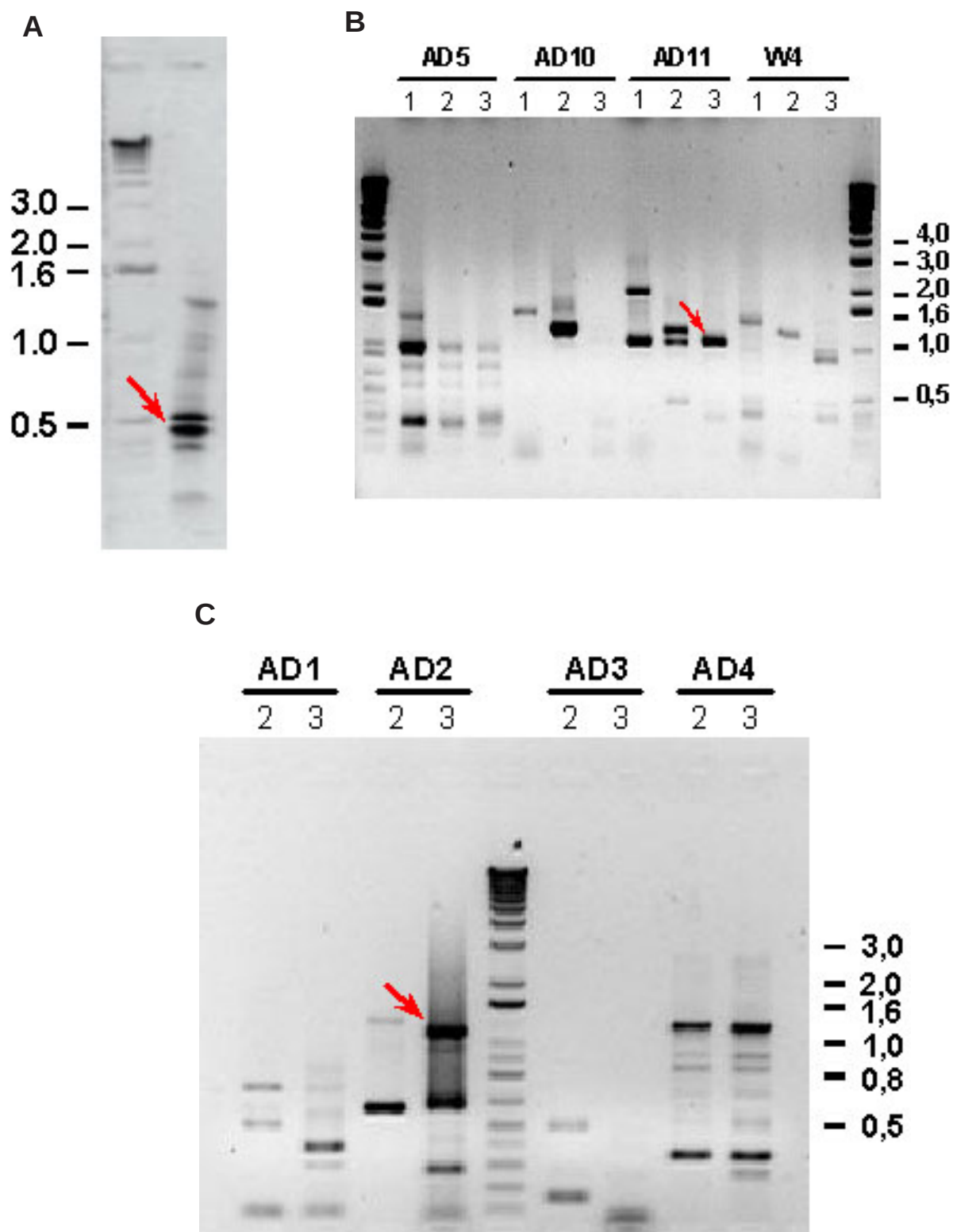


Figura 1. Amplificação do gene *cry8Ga* da estirpe S811 de *B. thuringiensis*. (A) PCR inicial; (B) Primeiro Tail-PCR; (C) Segundo Tail-PCR. Os primers arbitrários utilizados aparecem indicados acima dos poços. 1, 2 e 3 indicam as sucessivas rodadas de amplificação. Produtos potencialmente positivos e que foram clonados e seqüenciados estão indicados por setas. Marcadores de massa molecular estão indicados em kb.

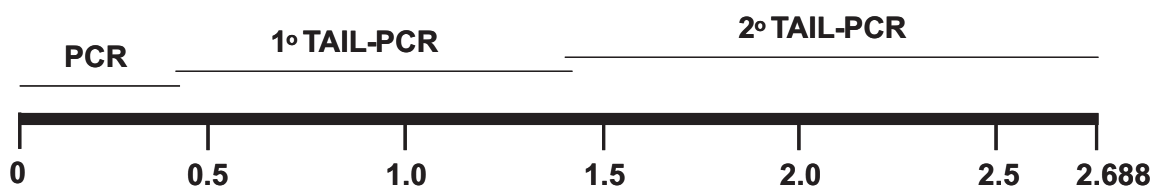


Figura 2. Representação esquemática da estratégia de clonagem do gene *cry8Ga*. A escala representa o número de pares de bases.

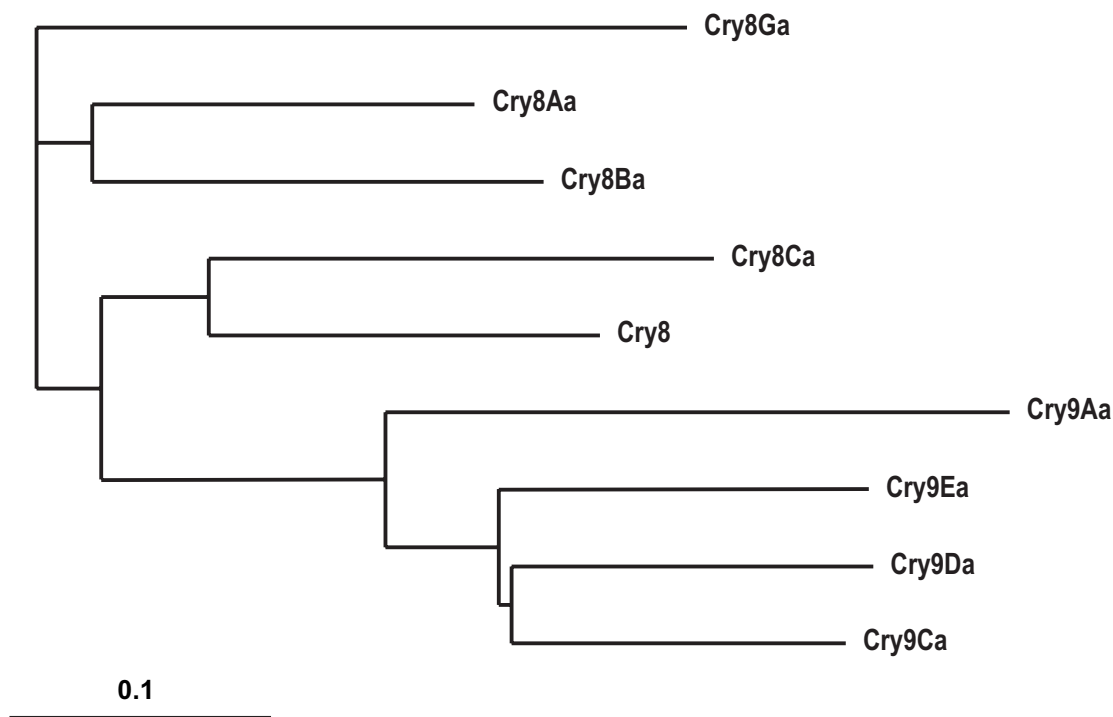


Figura 3. Dendrograma do alinhamento da sequência protéica predita do gene *cry8Ga* com outras d-endotoxinas Cry8 e Cry9. O alinhamento foi feito usando o programa CLUSTALW.

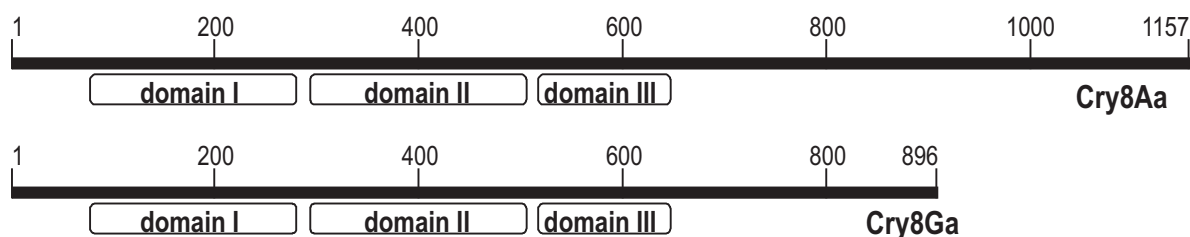


Figura 4. Representação esquemática dos domínios estruturais da d-endotoxina Cry8Ga nova e comparação com Cry8Aa. O domínio I está relacionado com a inserção da proteína na membrana epitelial do intestino do inseto e a formação de poros. Os domínios II e III estão envolvidos com a ligação a receptores.

Tabela 1. Identidade média entre os domínios da d-endotoxina Cry8Ga e os domínios correspondentes em outras d-endotoxina Cry8.

	Cry8Ga				
	N-terminal	Domínio I	Domínio II	Domínio III	C-terminal
Cry8Aa	87.7%	48.6%	29.8%	35.5%	90.7%
Cry8Ba	89.8%	47.7%	31.3%	37.6%	91.1%
Cry8Ca	73.5%	57.7%	31.6%	33.3%	68.6%

Síntese de um gene sintético *cry8Ga* por TDL-PCR

Os primeiros trabalhos de transferência de genes *cry* para plantas relataram níveis de expressão muito baixos (Vaeck *et al.*, 1987; Barton *et al.*, 1987). Trabalhos posteriores verificaram que segmentos com alto conteúdo de AT, comuns no genoma de *Bacillus*, eram interpretados pela maquinaria transcricional da planta como sinais de terminação, 'splicing', poliadenilação ou outros, levando ao término prematuro, a produção de proteínas truncadas e a um baixo nível de expressão (Diehn *et al.* 1996). Ou seja, para a expressão de toxinas *cry* em plantas, as seqüências originais dos genes devem ser modificadas, através da substituição de resíduos na seqüência nucleotídica original de modo a criar códons utilizados preferencialmente pela célula vegetal e eliminar possíveis sinais de processamento utilizados pela maquinaria transcricional e traducional das plantas.

O desenho do gene *cry8Ga* sintético foi baseado na seqüência do gene *cry8Ga* original, incluindo apenas à parte N-terminal da proteína e os três domínios responsáveis pela atividade inseticida, constituída de cerca de 666 aminoácidos. A seqüência protéica final do gene *cry8Ga* sintético é idêntica a seqüência original. Um resumo das modificações introduzidas é apresentado na tabela 2. A seqüência do gene *cry8Ga* foi dividida em três blocos denominados A, B e C com 595, 665 e 753 pb, respectivamente. Os blocos A e B são delimitados por um sítio de *Nde* I e os blocos B e C por um sítio de *Spe* I. Para a síntese do bloco A foram desenhados 6 'primers', para o bloco B, 7 'primers' e para o bloco C, 9 'primers'. Os oligonucleotídeos nas extremidades de cada bloco contêm seqüências únicas não complementares ao gene original, para a posterior amplificação seletiva por PCR. Dentro de cada bloco não há sobreposição na seqüência dos oligonucleotídeos. Uma representação esquemática da estratégia de síntese é mostrada na figura 5.

Tabela 2. Modificações introduzidas no gene *cry8Ga* sintético.

	Segmento N-terminal e domínios I, II e III do gene <i>cry8Ga</i>	<i>cry8Ga</i> sintético
Pares de base (pb)	1998 pb = 666 aa	1998 pb = 666 aa
A	690	558
T	597	565
C	333	441
G	378	434
A+T	1287 (64.4%)	1123 (56.2%)
C+G	711 (35.6%)	875 (43.8%)
pb modificados	0	262 (13%)
Códons modificados	0	261 (39%)
Motivo ATTTA	17	0
Sítios de poliadenilação putativos	26	1
Códons NCG	23	0
Códons NTA	72	0

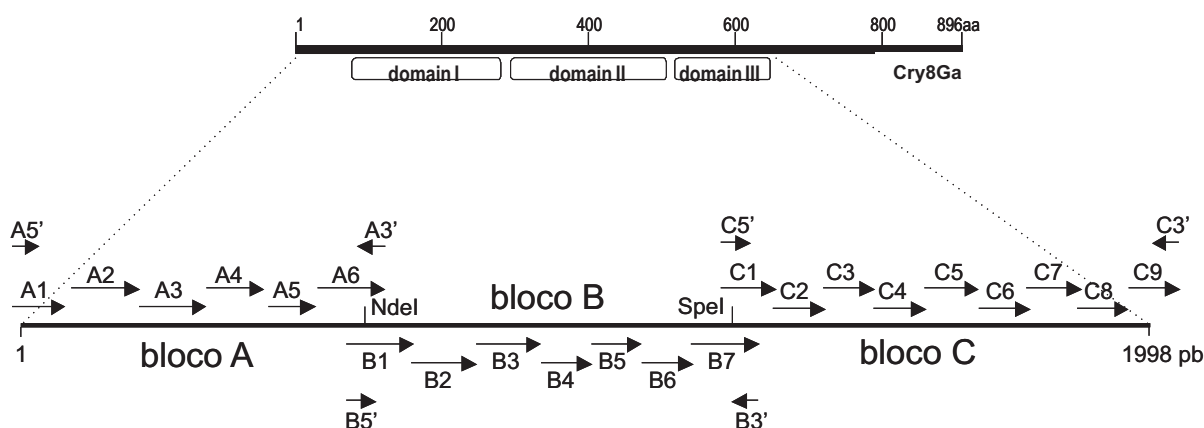


Figura 5. Representação esquemática da estratégia de construção do gene sintético *cry8Ga*. A figura acima corresponde a sequência protéica e a figura abaixo a sequência nucleotídica. A orientação e posição dos “primers” desenhados estão indicadas por setas.

PERSPECTIVAS

O isolamento do gene *cry8Ga* abre uma série de novas perspectivas em relação ao controle do bicudo. O passo imediato consiste em transformar plantas de algodão com o gene *cry8Ga* sintético visando à obtenção de cultivares com resistência ao bicudo. Adicionalmente o gene *cry8Ga* está sendo utilizado isoladamente ou em combinação como o gene *cry3A*, para a produção de bibliotecas combinatórias através das técnicas de DNA ‘Shuffling’ e ‘Phage display’, visando o aumento do repertório de toxina Cry ativas contra o bicudo (Grossi de Sá *et al.*, 2004). Também será possível isolar o receptor do gene no intestino do bicudo e através de estudos de modelagem molecular, identificar resíduos chave envolvidos na ligação e atividade da endotoxina. O conhecimento gerado por estes estudos permitirá a manipulação e o desenho racional do gene *cry8Ga* no sentido de aumentar sua atividade especificidade sobre o bicudo ou sobre outras pragas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARTON, K.A., WHITELEY, H.R., YANG, N. *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin expressed in transgenic *Nicotiana tabacum* provides resistance to lepidopteran insects. **Plant Physiology**, v. 85, p. 1103-1109, 1987.
- BATISTA, J.A.N., MAGALHÃES, M.T.Q., OLIVEIRA-NETO, O.B., FRAGOSO, R.R., SILVA, S.M.B., MARTINS, N.F., MONNERAT, R.G., GROSSI DE SÁ, M.F. Molecular cloning of a new *cry8* gene of a *Bacillus thuringiensis* strain highly effective against cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*). In: **Anais do IV Congresso Brasileiro de Algodão**, Goiânia, 2003.
- BRAVO, A., SARABIA, S., LOPEZ, L., ONTIVEROS, H., ABARCA, C., ORTIZ, A., ORTIZ, M., LINA, L., VILLALOBOS, F.J., PEÑA, G., NUÑEZ-VALDEZ, M.E., SOBERÓN, M., QUINTERO, R. Characterization of *cry* Genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* Strain Collection. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 4965-4972, 1998.
- DIEHN, S.H., ROCHER, E.J., GREEN, P.J. Problems that can limit the expression of foreign genes in plants: lessons to be learned from *B.t.* toxin genes. **Genetic Engineering**, v. 18, p. 83-99. 1996
- GROSSI DE SÁ, M.F., SILVA, M.C., BRUNETA, P., OLIVEIRA, G., FIGUEIRA, E.L.Z. Toxinas Cry e sua aplicação no controle do bicudo do algodoeiro. In: **Resumos do XX Congresso Brasileiro de Entomologia**, Gramado, p. 145, 2004.
- JOUANIN, L., BONADE-BOTTINO, M., GIRARD, C., MORROT, G., GIBAMD, M. Transgenic plants for insect resistance-Review. **Plant Science**, v. 131, p. 1-11, 1998.
- LIU, Y., WHITTIER, R.F. Thermal asymmetric interlaced PCR: Automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking. **Genomics**, v. 25, p. 674-681, 1995.

MAGALHÃES, M.T.Q., SILVA, S.M.B., FRAGOSO, R.R., OLIVEIRA-NETO, O.B., BATISTA, J.A.N., MONNERAT, R.G., GROSSI DE SÁ, M.F. Caracterização e clonagem de estirpes de *Bacillus thuringiensis* ativas contra bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis*). In: **Anais do VI Encontro do Talento Estudantil da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, Brasília, p. 31, 2001.

PERLAK, F.J., DEATON, R.W., ARMSTRONG, T.A., FUCHS, R.L., SIMS, S.R., GREENPLATE, J.T., FISCHHOFF, D.A. Insect resistant cotton plants. **BioTechnology**, v. 8, p. 939-963, 1990.

STRIZHOV, N.; KELLER, M.; MATHUR, J.; KONCZ-KÁLMÁN, K.; BOSCH, D.; PRUDOVSKY, E.; SCHELL, J.; SNEH, B.; KONCZ, C.; ZILBERSTEIN, A. A synthetic *cryIC* gene, encoding a *Bacillus thuringiensis* endotoxin, confers *Spodoptera* resistance in alfalfa and tobacco. **Proceedings of the National Academy of Science. USA**, v. 93, p. 15012-15017, 1996.

VAECK, M.; REYNAERTS, A.; HÖEFTE, H.; JANSSENS, S.; DE BEUCKLEER, M.; DEAN, C.; ZABEAU, M.; VAN MONTAGU, M.; LEEMANS, J. Transgenic plants protected from insect attack. **Nature**, v. 328, p. 33-37, 1987.

12 - CryDATA – A STRUCTURAL DATABASE FOR DELTA ENDOTOXIN FROM *Bacillus thuringiensis*

Fonseca, G.L.S.²; Ramirez M.D.M.²; Porto, D.P.; Vilela, F.B.; Solon A², Togawa R.C.¹; Costa, M.M.¹ e Martins N.F.¹

¹ EMBRAPA – Recursos Genéticos e Biotecnologia ; ² Universidade Católica de Brasília

RESUMO

As δ -endotoxinas ou toxinas Bt são proteínas inseticidas presentes em inclusões cristalinas produzidas por cepas da bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis*. A primeira estrutura molecular de proteína cristal (Cry3A) foi determinada por Li *et al.*, (1991) e desde então poucos progressos foram alcançados, uma vez que somente existem quatro estruturas tridimensionais experimentalmente determinadas para essas toxinas. Contraditoriamente, o número de novos genes de δ -endotoxinas descoberto chega a 290 seqüências. O interesse biotecnológico dessas toxinas é crescente, uma vez que as δ -endotoxinas compõe diversos produtos de controle das larvas. O objetivo do trabalho é estudar as relações entre estrutura e função das toxinas através de modelagem molecular por homologia e reconhecimento de enovelamento. Buscas em bancos de dados por comparação de seqüência foram realizados com o uso de programas com BLAST e CLUSTAL W, além do MODELLER 4.0 para a construção das coordenadas atômicas. Este trabalho apresenta a construção de um banco de dados de modelos de δ -endotoxinas e sua avaliação estrutural. Bem como a visualização e acesso ao banco de 60 modelos refinados.

INTRODUÇÃO

As δ -endotoxinas ou toxinas Bt são proteínas inseticidas presentes em inclusões cristalinas produzidas por cepas da bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis*, durante a esporulação. Os cristais de δ -endotoxinas (toxina Bt) são ingeridos pelo inseto, e solubilizam-se em contacto com o meio alcalino do trato digestório liberando um fragmento de ~55-70 kDa, conforme o tipo de proteína Cry. Uma vez liberados esses peptídeos inserem-se na membrana das células epiteliais do intestino, criando poros, e provocando um desequilíbrio eletrolítico que leva o inseto à morte.

As moléculas de δ -Endotoxina possuem dois domínios de ligação. O primeiro localiza-se no N-terminal e está associado ao processamento proteolítico de ativação. Os primeiros aminoácidos implicados nos contatos observados em Cry3A são LEU 599, THR 600, ASP 287, VAL 288, LEU 285, ARG 289, GLU 294, LEU 290, TYR 291, VAL 276, LYS 293. O segundo segmento em alça que se agrupa são os segmentos dos aminoácidos ASP 287, LEU 290, VAL 288, TYR 291, PRO 292, LYS 293 e ARG 289 (Loseva *et al.*, 2001).

A primeira estrutura molecular de proteína cristal (Cry3A) foi determinada por Li *et al.*, (1991). Esses estudos contribuíram para o conhecimento sobre o modo de ação dessas toxinas. A estrutura tridimensional das formas ativadas das proteínas Cry consiste de três domínios. O domínio I (N-terminal) consiste de 7 α -hélices, sendo 6 hélices anfipáticas circulando uma hélice central, a α -hélice 5 hidrofóbica. O domínio II é formado por três folhas β -antiparalelas ao redor de um cerne hidrofóbico, terminando em alças no ápice da molécula e o domínio III (C-terminal) que consiste de duas folhas β -antiparalelas formando um β -sanduíche. O domínio I está envolvido na inserção da proteína na membrana e na formação do poro, já os domínios II e III estão envolvidos no reconhecimento e ligação ao receptor. Acredita-se que o domínio III esteja fortemente envolvido com a estabilidade estrutural (Herrero *et al.*, 2004).

Mais de 290 genes cry foram determinados e classificados em 32 famílias de diferentes subgrupos com base na identidade da seqüência de aminoácidos ([www.http://epunix.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/ver.html](http://epunix.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/ver.html)). As proteínas tóxicas contra

lepidópteros constituem os grupos Cry1, Cry2, Cry9 e Cry15; enquanto que as toxinas ativas contra insetos da ordem coleóptera são as toxinas Cry3, Cry7, e Cry8, bem como, as proteínas Cry1B e Cry1I, as quais apresentam dupla atividade contra lepidópteros e coleópteros. As proteínas Cry5, Cry6, Cry12, Cry13, Cry14 e Cry21 apresentam atividade contra nematóides, Cry22 com atividade contra nematóides e himenópteros e Cry2, Cry4, Cry10, Cry11, Cry16, Cry17, Cry18, Cry19, Cry20 e Cyt são tóxicos contra insetos da ordem díptera (Bravo *et al.*, 1998).

MATERIAL E MÉTODOS

Análise de seqüências

As seqüências de interesse foram comparadas com as já existentes em bancos de dados, identificando-se assim proteínas homólogas através de algoritmos de alinhamento local e global como BLAST (Altschul *et al.*, 1997).

Modelagem molecular

Para a realização de estudos de modelagem, buscas em bancos de dados usando programas de comparação de seqüência contra o banco de dados de estruturas tridimensionais, o Protein DataBank. Foram utilizados programas especializados em reconhecimento de dobramento e CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994) para a construção inicial de alinhamentos múltiplos. Uma variedade de ferramentas via Internet foi utilizada nos experimentos de threading. Os modelos das proteínas foram construídos usando o pacote MODELLER-4 (Sali e Blundell, 1993). Estas análises visaram a complementaridade dos estudos dos genes e suas proteínas em nível experimental buscando um melhor entendimento da estrutura e do funcionamento das proteínas. As metodologias de busca por enovelamentos foram descritas por Douguet e Labesse, 2004.

Visualização e acesso

A visualização foi desenvolvida sob o sistema operacional Red Hat Linux usando linguagem de programação Java™. A interconexão do banco foi feita sobre a arquitetura de cliente-servidor adotada pela tecnologia CORBA (Common Object Request Broker Architecture). Os padrões permitem a interação entre o Banco Cry Data e outros programas suportados pela CORBA.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 295 genes de δ -endotoxinas identificados somente 4 tiveram sua estrutura determinada experimentalmente por difração de Raios-X: 1CIY, 1DLC, 1I5P, 1JI6 [4]. Com o objetivo de estudar as relações entre estrutura e função dessas toxinas foi necessário determinar os modelos das proteínas. A falta de estruturas experimentais para as δ -endotoxinas é decorrente das dificuldades de cristalização das toxinas (Kouskoura, 2001). Causando assim a grande lacuna entre o número de seqüências conhecidas e o número de estruturas determinadas. O banco de dados CryDATA de modelos de δ -endotoxinas pretende preencher parte desta vacância, fornecendo um ponto de partida para estudos estruturais.

O primeiro passo foi usar a modelagem comparativa automatizada, onde as seqüências foram alinhadas com as diferentes possibilidades de moldes e selecionadas as mais idênticas. A precisão da metodologia depende da percentagem de identidade entre a proteína alvo e o molde aproximado. Isto é, quanto maior a percentagem de identidade entre o alvo e o molde mais preciso será o modelo estrutural e menor a probabilidade de discrepâncias no nível de cadeias laterais.

O segundo passo foi avaliar o empacotamento e outras características dos modelos através de três métodos: Procheck, Prosall e Verify. Os resultados estão listados na tabela 1. Os modelos aceitos pelos critérios do mapa de Ramachandran possuem mais que 85%

dos resíduos em posições aceitáveis. O critério usado para aceitar o modelo foi um erro médio de 2 a 2.5% e um desvio padrão de até 0.2 no programa Verify 3D (Laskowski, 1993).

A grande parte dos modelos construídos apresentou identidade de 55% a 85% com as estruturas conhecidas de δ -endotoxinas. E embora muitos modelos tenham sido aceitos por este critério foi necessário avaliar cuidadosamente cada uma das moléculas. Os modelos menos favoráveis foram detectados com membros das famílias Cry9, Cry25 e Cry31 a 33. Membros da família Cry14 e Cry24 apresentam identidade abaixo de 30%, tornando o modelo de baixa confiabilidade. Nestes casos as seqüências foram submetidas ao reconhecimento de enovelamento e algumas coordenadas puderam ser transferidas, contudo as discrepâncias de grande extensão na seqüência não foram corrigidas. Por outro lado os membros das famílias de Cry1 a Cry3 mostraram um percentual de identidade superior a 60% resultando em modelos de discrepância mínima e acurácia máxima (Figure 1 e 2).

Uma vez selecionados para depósito no banco de dados os modelos podem ser adquiridos e visualizados no banco CryDATA. Através de programação em JAVA script que oferece uma interface gráfica amigável e facilmente aplicável à manipulação dos dados, permitindo as funções de inserção, remoção e visualização dos dados (Figure 3).

A saída do display do banco de dados para estruturas é o programa RASMOL (Bernstein,2000) e as seqüências são acessadas através de um link ao GenBANK em <http://ncbi.nlm.nih.gov>.

Tabela 1 – Avaliação dos modelos estruturais de δ -endotoxinas por ProsaII, Eval3D e Verify3D.

<i>Toxin nomenclature</i>	<i>Access number</i>	ProsaII	Eval 3D	Verify3D	Error/Mean
Cry1Aa6	U43605	0.103	-0.473	0.205	4.31/42.0
Cry1Ac3	X54159	0.391	-0.478	0.209	9.72/30.0
Cry1Ac6	U43606	0.373	-0.564	0.129	2.58/95.8
Cry1Ac13	AF148644	0.371	-0.560	0.129	2.60/96.0
Cry1Ca1	X07518	0.287	-0.589	0.128	2.59/95.9
Cry1Ca6	AF215647	0.349	-0.458	0.148	2.56/95.9
Cry1Ia1	X62821	0.489	-0.789	0.113	2.67/96.2
Cry1Ia2	M98544	0.504	-0.485	0.111	2.67/96.2
Cry1Ia3	L36338	-0.116	-0.753	0.214	2.55/95.2
Cry1Ia4	L49391	0.494	-0.221	0.111	2.66/96.1
Cry1Ia5	Y08920	0.502	-0.487	0.111	2.67/96.1
Cry1Ia8	AF373207	0.353	-0.354	0.132	2.57/95.8
Cry1Ib1	U07642	0.857	-0.965	0.113	2.55/94.2
Cry2Aa1	M31738	-0.872	-0.459	1.328	2.61/96.2
Cry2Aa2	M23723	-0.872	-0.746	0.456	2.61/96.2
Cry2Aa4	AF047038	0.680	-0.551	0.129	2.40/94.4
Cry2Aa5	AJ132464	0.531	-0.415	0.116	2.43/94.0
Cry2Aa6	AJ132465	0.416	-0.289	0.217	2.43/94.0
Cry2Aa7	AJ132463	0.803	-0.683	0.120	2.43/94.5
Cry2Ab1	M23724	-0.868	1.29	0.422	2.60/96.2
Cry2Ab2	X55416	0.372	-0.244	0.128	2.35/95.0
Cry2Ab3	AF164666	0.372	-0.244	0.128	2.35/95.0
Cry2Ac1	X57252	-0.060	0.315	0.255	2.93/92.8
Cry3Aa2	J02978	0.438	-0.335	0.103	2.51/95.8
Cry3Aa3	Y00420	0.438	-0.335	0.103	2.51/95.8
Cry3Aa6	U10985	0.438	-0.335	0.103	2.51/95.8
Cry3Ba1	X17123	-1.084	1.528	0.444	2.66/93.6
Cry3Bb1	M89794	-1.084	1.528	0.444	2.66/93.6
Cry3Bb2	U31633	-1.088	1.531	0.443	2.68/93.6
Cry3Ca1	X59797	-0.857	1.257	0.400	2.29/98.6
Cry9Da1	D85560	0.222	-0.081	0.141	2.83/88.1
Cry9Da2	AF042733	0.221	-0.081	0.141	2.83/88.1
Cry10Aa1	M12662	0.618	-0.558	0.077	2.77/94.0
Cry11Aa1	M31737	0.745	-0.558	0.077	2.56/94.3
Cry12Aa1	X86902	1.035	-0.928	0.107	2.46/92.6
Cry14Aa1	U13955	-0.997	0.009	0.165	2.18/88.4
Cry15Aa1	M76442	0.635	-0.558	0.077	2.90/83.0
Cry16Aa1	X94146	0.635	0.093	1.82	2.87/88.0
Cry17Aa1	X99478	0.635	-0.562	0.073	2.90/83.0
Cry18Aa1	X99049	0.647	-0.564	0.083	5.45/50.0
Cry19Aa1	Y07603	0.353	0.190	0.078	2.84/88.1
Cry19Ba1	D88381	0.595	-0.473	0.122	2.70/94.5
Cry20Aa1	U82518	0.842	-0.073	0.112	2.55/96.2
Cry23Aa1	AAF76375	0.057	-0.076	-0.019	8.23/35.2
Cry24Aa1	BAD32657	0.617	-0.489	0.128	2.71/91.9
Cry25Aa1	U88189	0.548	-0.073	0.120	2.75/95.7
Cry31Aa1	AB031065	0.918	-0.800	0.118	2.65/91.2
Cry33Aa1	AAL26871	0.654	-0.654	0	0.99/100
Cry34Aa1	AAG50341	0.972	-0.836	0.107	2.46/92.6
Cry35Aa1	AAG50342	0.908	-0.780	0.128	2.70/100
Cry36Aa1	AAK64558	0.735	-0.696	0.039	4.58/62.2
Cry37Aa1	AAF76376	-0.514	0.658	0.144	3.78/68.1
Cry38Aa1	AAK64559	0.226	-0.121	0.105	2.76/95.7
Cry39Aa1	BAB72016	0.310	-0.157	0.153	2.52/94.4
Cry40Aa1	BAB72018	0.229	-0.169	0.130	2.44/95.8

CLUSTAL W (1.82) multiple sequence alignment

```

1C1Y      -----IETGYPIDISLSLTQFLLSSEFVP GA GFVLGL 32
CryIA6    MDNMPNINEC IPYNCLSMPEVEVL GGERIETGYPIDISLSLTQFLLSSEFVP GA GFVLGL 60
CryIAc13  MDNMPNINEC IPYNCLSMPEVEVL GGERIETGYPIDISLSLTQFLLSSEFVP GA GFVLGL 60
CryIAc3   MDNMPNINEC IPYNCLSMPEVEVL GGERIETGYPIDISLSLTQFLLSSEFVP GA GFVLGL 60
CryIAc6   MDNMPNINEC IPYNCLSMPEVEVL GGERIETGYPIDISLSLTQFLLSSEFVP GA GFVLGL 60
          *****

1C1Y      VDIIGGIFGPSQMDAFLVQIEQLINQR IEEFARNQAIS RLEGLSMLYQIYAE SFRDMEAD 92
CryIA6    VDIIGGIFGPSQMDAFLVQIEQLINQR IEEFARNQAIS RLEGLSMLYQIYAE SFRDMEAD 120
CryIAc13  VDIIGGIFGPSQMDAFLVQIEQLINQR IEEFARNQAIS RLEGLSMLYQIYAE SFRDMEAD 120
CryIAc3   VDIIGGIFGPSQMDAFLVQIEQLINQR IEEFARNQAIS RLEGLSMLYQIYAE SFRDMEAD 120
CryIAc6   VDIIGGIFGPSQMDAFLVQIEQLINQR IEEFARNQAIS RLEGLSMLYQIYAE SFRDMEAD 120
          *****

1C1Y      PTMPALREEMRIQFNDMMNSALTTA IPLLA VQNTQVPLL SVYVQAANLHL SVLRDVSVP GQ 152
CryIA6    PTMPALREEMRIQFNDMMNSALTTA IPLLA VQNTQVPLL SVYVQAANLHL SVLRDVSVP GQ 180
CryIAc13  PTMPALREEMRIQFNDMMNSALTTA IPLFA VQNTQVPLL SVYVQAANLHL SVLRDVSVP GQ 180
CryIAc3   PTMPALREEMRIQFNDMMNSALTTA IPLLA VQNTQVPLL SVYVQAANLHL SVLRDVSVP GQ 180
CryIAc6   PTMPALREEMRIQFNDMMNSALTTA IPLLA VQNTQVPLL SVYVQAANLHL SVLRDVSVP GQ 180
          *****

1C1Y      HQGFDAAITNSKYNLTELIGNYTDGAVHGYNTGLEKGGPDSRDGVHYNQFRELTLTV 212
CryIA6    HQGFDAAITNSKYNLTELIGNYTDGAVHGYNTGLEKGGPDSRDGVHYNQFRELTLTV 240
CryIAc13  HQGFDAAITNSKYNLTELIGNYTDGAVHGYNTGLEKGGPDSRDGVHYNQFRELTLTV 240
CryIAc3   HQGFDAAITNSKYNLTELIGNYTDGAVHGYNTGLEKGGPDSRDGVHYNQFRELTLTV 240
CryIAc6   HQGFDAAITNSKYNLTELIGNYTDGAVHGYNTGLEKGGPDSRDGVHYNQFRELTLTV 240
          *****

1C1Y      LDIVALEFMYDSRRYP IRTVSQLTREI YTNPVLENFDC SFRGMA QR IEQNIRQPHLMD IL 272
CryIA6    LDIVALEFMYDSRRYP IRTVSQLTREI YTNPVLENFDC SFRGMA QR IEQNIRQPHLMD IL 300
CryIAc13  LDIVALEFMYDSRRYP IRTVSQLTREI YTNPVLENFDC SFRGMA QR IEQNIRQPHLMD IL 300
CryIAc3   LDIVALEFMYDSRRYP IRTVSQLTREI YTNPVLENFDC SFRGSA QG IERSIRSPHMD IL 300
CryIAc6   LDIVALEFMYDSRRYP IRTVSQLTREI YTNPVLENFDC SFRGSA QG IERSIRSPHMD IL 300
          *****

1C1Y      NSITIYTDVHRGFMYW3GHQITASPVGFSGPEFAFPLFGNA GMAAPP-VLVSLTGLGIFR 331
CryIA6    NSITIYTDVHRGFMYW3GHQITASPVGFSGPEFAFPLFGNA GMAAPP-VLVSLTGLGIFR 359
CryIAc13  NSITIYTDVHRGFMYW3GHQITASPVGFSGPEFAFPLFGNA GMAAPP-VLVSLTGLGIFR 359
CryIAc3   NSITIYDAHRGYYW3GHQIMASPVGFSGPEFTFPLVGTMGMAAPQQRIVAQLGQGVYR 360
CryIAc6   NSITIYDAHRGYYW3GHQIMASPVGFSGPEFTFPLVGTMGMAAPQQRIVAQLGQGVYR 360
          *****

1C1Y      TLSSPLXERI ILGS GPMNQELFVLDGTEF3FA SLTTMLPSTIYRQR GTVDSLDIIPPQIN 391
CryIA6    TLSSPLXERI ILGS GPMNQELFVLDGTEF3FA SLTTMLPSTIYRQR GTVDSLDIIPPQIN 419
CryIAc13  TLSSPLXERI ILGS GPMNQELFVLDGTEF3FA SLTTMLPSTIYRQR GTVDSLDIIPPQIN 419
CryIAc3   TLSSPTFYRPFM-I GINNQQLSVLDGTEFAVG-TSSMLPSAVYRN3 GTVDSLDIIPPQIN 418
CryIAc6   TLSSPTFYRPFM-I GINNQQLSVLDGTEFAVG-TSSMLPSAVYRN3 GTVDSLDIIPPQIN 418
          *****

1C1Y      SVPPRAGF SHLSHVTMLS QAG-AVYTLRAPTF3GQHRSAEFNNI IPS3QITQIELTK3 450
CryIA6    SVPPRAGF SHLSHVTMLS QAG-AVYTLRAPTF3GQHRSAEFNNI IPS3QITQIELTK3 478
CryIAc13  SVPPRAGF SHLSHVTMLS QAG-AVYTLRAPTF3GQHRSAEFNNI IPS3QITQIELTK3 478
CryIAc3   MVPPRQGF SHLSHVSMTFR3G333SV3 IIRAPMF3GQHRSAEFNNI IASDSITQIEAVKG 478
CryIAc6   MVPPRQGF SHLSHVSMTFR3G333SV3 IIRAPMF3GQHRSAEFNNI IASDSITQIEAVKG 478
          *****

1C1Y      TNLGS GTSVWKGPGFTGGD ILRETSPGQIS TLEQNI TAPL- ---3 QRYEVRIRYASTTN 505
CryIA6    TNLGS GTSVWKGPGFTGGD ILRETSPGQIS TLEQNI TAPL- ---3 QRYEVRIRYASTTN 533
CryIAc13  TNLGS GTSVWKGPGFTGGD ILRETSPGQIS TLEQNI TAPL- ---3 QRYEVRIRYASTTN 533
CryIAc3   NPLFNG-SVI3GPGFTGGDLVRLN33LNNI QNRGYIEVPIHFPS TS TRYEVRYASTTN 537
CryIAc6   NPLFNG-SVI3GPGFTGGDLVRLN33LNNI QNRGYIEVPIHFPS TS TRYEVRYASTTN 537
          *****

1C1Y      LQFHTSIDGRFINQGNF3ATMS3G3SMLQSG3FRTVGFTTFMF3NGSSVFTLSA3VFM3G 565
CryIA6    LQFHTSIDGRFINQGNF3ATMS3G3SMLQSG3FRTVGFTTFMF3NGSSVFTLSA3VFM3G 593
CryIAc13  LQFHTSIDGRFINQGNF3ATMS3G3SMLQSG3FRTVGFTTFMF3NGSSVFTLSA3VFM3G 593
CryIAc3   IHLNWNQGN33 IFSNTVPA TATSLDMLQSS3DFGYTESANAFT33LGN---IYGVNMF3GT 594
CryIAc6   IHLNWNQGN33 IFSNTVPA TATSLDMLQSS3DFGYTESANAFT33LGN---IYGVNMF3GT 594
          *****

1C1Y      NEWVIDRIEFVPAEVTFEAYDLER----- 590
CryIA6    NEWVIDRIEFVPAEVTFEAYDLERAQ----- 620
CryIAc13  NEWVIDRIEFVPAEVTFEAYDLERAQKAVNELFTS3NQGILKTDVTDYHIDQ3SMLVEC 653
CryIAc3   AGVVIDREFEIPVATATLEAYENLE----- 618
CryIAc6   AGVVIDREFEIPV----- 607
          *****

```

Figura1: Alinhamento múltiplo das toxinas da família Cry1 com o molde 1C1Y realizado pelo programa ClustalW. Destaque aos blocos de estrutura secundária em amarelo as α -hélices e em cinza as fitas- β . Os resíduos de aminoácidos idênticos estão marcados por * e similares por . ou :

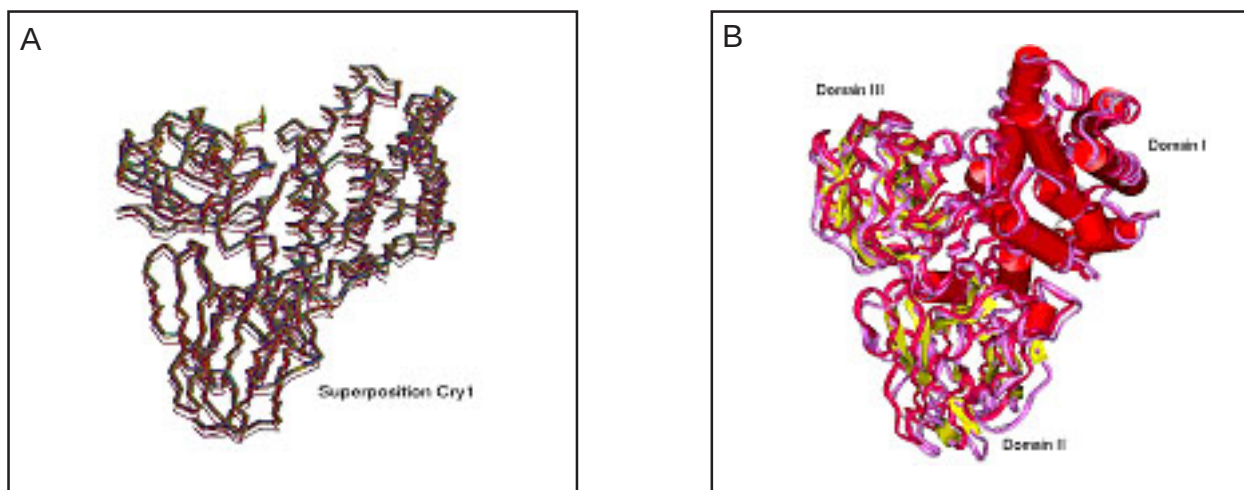


Figura 2: A. Sobreposição estrutural de modelos de δ -endotoxinas da família Cry1 com o molde 1CIY. As linhas representam as estruturas de 1CIY, CryIA6, Cry1AC13, Cry1Ac3, e Cry1Ac6 respectivamente. B. Sobreposição estrutural da família Cry2 destacando a estrutura secundária de α -hélices e folhas beta em Cry2Aa1 e Cry2Ab1.

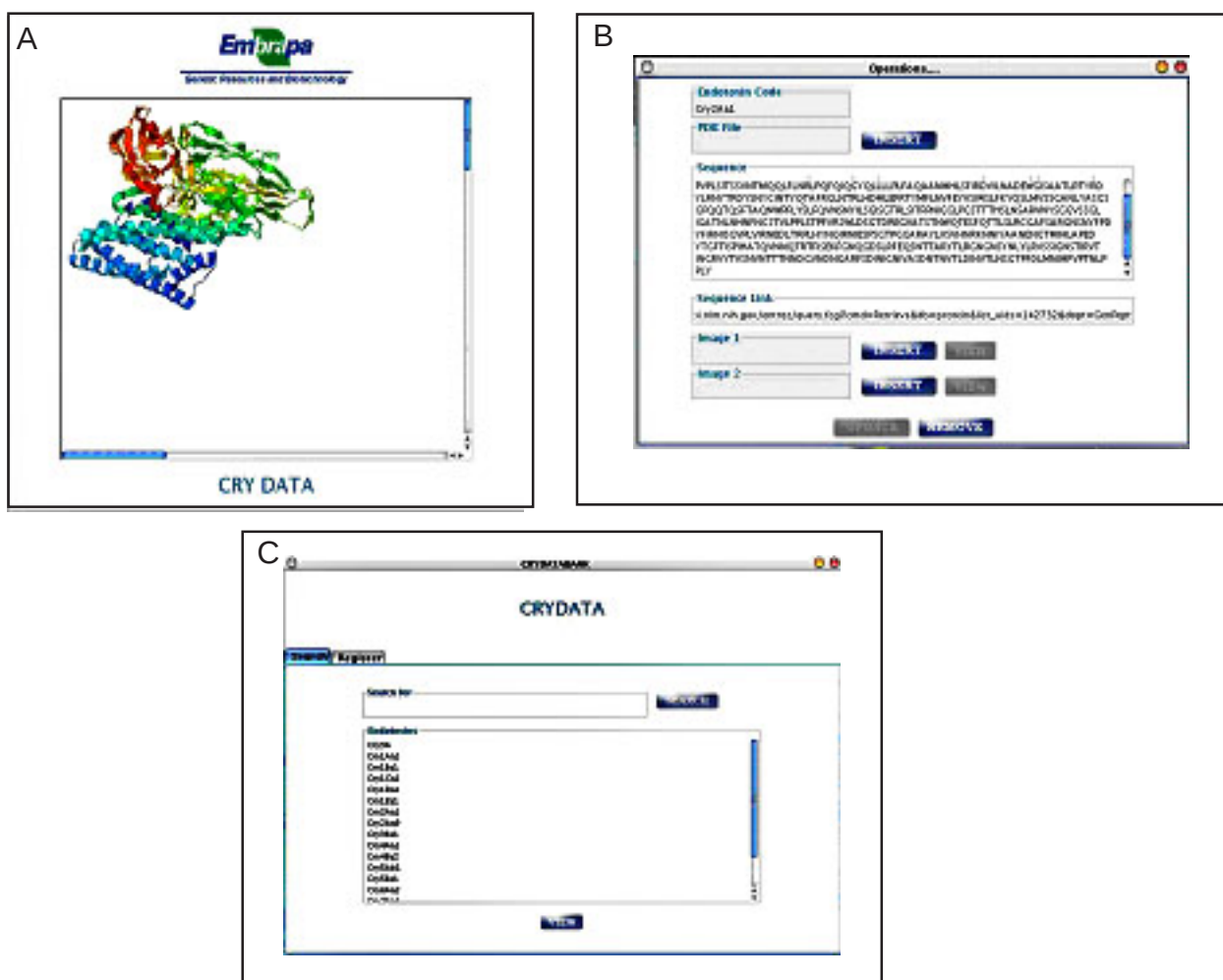


Figura 3: Implementação do CryDATA através de JAVA Script. A. Tela de abertura, B. Tela de busca por sequência C. Aplicação de busca por estrutura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTSCHUL S.F., MADDEN T.L., SCHAFER A.A., ZHANG J., MILLER W., LIPMAN D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**. V. 25, P.3389-3402, 1997.
- BERNSTEIN H.J. Recent changes to RasMol, recombining the variants. **Trends in Biochemical Science**, v. 25, n.9, p.453-455, 2000.
- BRAVO,A.; SARABIA,S.; LOPEZ,L.; ONTIVEROS,H.; ABARCA,C.; ORTIZ,A.; ORTIZ,M.; LINA,L.; VILLALOBOS,F.J.; PENA,G.; NUNEZ-VALDEZ,M.E.; SOBERON,M.; QUINTERO,R. Characterization of cry genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, n.12, p. 4965-4972, 1998.
- CORBA: <http://java.sun.com/j2ee/corba/>
- DOUGUET D. AND LABESSE G. Easier threading through web-based comparisons and cross-validations, **Bioinformatics**, v.17, p.752-753, 2004.
- HERRERO S. , GONZÁLEZ-CABRERA J., FERRE J., BAKKER, P.L. AND DE MAAGD A.R. Mutations in the Bacillus thuringiensis Cry1Ca toxin demonstrate the role of domain II and III in the specificity towards Spodoptera exigua larvae. **Biochemical Journal**. Aug 23 (2004).
- JAVA: <http://java.sun.com/>
- KOUSKOURA T., TICKNER C., CRICKMORE N. Expression and crystallization of an N-terminally activated form of the Bacillus thuringiensis Cry1Ca toxin. **Curr Microbiololy**, v.43, p.371-373, 2001.
- LASKOWSKI, R. A.; MCARTHUR, M. W.; MOSS, D. S.; THORNTON, J. M. PROCHECK: A program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal Applied Crystallography**, v. 26, p.283-291, 1993.
- LI J.; CARROLL J.; ELLAR D.J. - Crystal structure of insecticidal delta-endotoxin from Bacillus thuringiensis at 2.5 Å resolution. **Nature**, v. 353, n.6347, p.815-821, 1991.
- LOSEVA O.I., TIKTOPULO E.I., VASILIEV V.D., NIKULINA D., DOBRITSAA.P., POTEKHIN S.A. Structure of Cry3A delta-endotoxin within phospholipid membranes. **Biochemistry**, v.40, n.47, p.14143-51, 2001.
- SALIA. & BLUNDELL T.L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. **Journal of Molecular Biololgy**, v. 234, p. 779-815, 1993.
- THOMPSON,J.D.; HIGGINS,D.G.; GIBSON,T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res**, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

13 - JABURETOX-2EC: PEPTÍDEO RECOMBINANTE DERIVADO DE UREASE DE *Canavalia ensiformis* COM ATIVIDADE BIOINSETICIDA

Mulinari, F.^{1,2}; Stanisçuaski, F.²; Carlini, C.R.² e Grossi-de-Sá, M. F.¹

¹EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia; ²Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre-RS.

RESUMO

A transformação genética de plantas com genes exógenos codificando fatores de resistência a fitopatógenos é uma interessante estratégia para diminuir as perdas na produção agrícola devido ao ataque de insetos. Desta forma, estudos vêm sendo realizados com o intuito de obter diferentes proteínas inseticidas. Nosso grupo descreveu a atividade entomotóxica da Canatoxina (CNTX), uma isoforma de urease de *Canavalia ensiformis*, contra diferentes espécies de insetos. Sua toxicidade depende da liberação de um peptídeo interno de 10 kDa, denominado pepcanatox, gerado pela hidrólise da CNTX por enzimas tipo catepsina do trato digestivo de insetos suscetíveis. Uma terceira isoforma de urease foi clonada a partir de *C. ensiformis* e denominada JBURE-II. O gene *jbure-II* codifica uma seqüência polipeptídica predita com elevada identidade (86%) em relação a JBURE-I, a urease clássica. Neste trabalho, a partir da seqüência N-terminal do pepcanatox, desenhamos iniciadores para a amplificação de um fragmento de 270 pb, correspondente ao pepcanatox, a partir do gene de JBURE-II, que foi denominado *jaburetox-2Ec*. Este foi clonado no vetor de expressão pET 101 para obtenção de expressão heteróloga de Jaburetox-2Ec em células de *Escherichia coli* (BL21 star) em fusão com um epitopo V-5 e seis histidinas na extremidade C-terminal do peptídeo. Jaburetox-2Ec recombinante foi purificado por cromatografia de afinidade a Ni (Ni-NTA) e utilizado no bioensaio contra o hemiptero *Dysdercus peruvianus* (percevejo manchador da maçã de algodoeiro). Ninfas de 2º estágio foram alimentadas com dietas de farinha de algodão contendo Jaburetox-2Ec 0,02% m/m e após 12 dias, todos os insetos estavam mortos. Foram também realizados ensaios contra baratas *Blattella germanica*, utilizando dieta de ração para gatos contendo 0,1% m/m de Jaburetox-2Ec. Da mesma forma, observou-se 100% de mortalidade dos insetos, após 3 dias de ingestão da dieta. Estes resultados despertam o interesse na investigação do potencial deste peptídeo para uso como bioinseticida doméstico e/ou agrícola, bem como a geração de plantas transgênicas resistentes a insetos.

INTRODUÇÃO

A transformação genética de plantas com genes exógenos codificando fatores de resistência a pragas é uma interessante estratégia para diminuir as perdas na produção agrícola devido ao ataque de insetos. Desta forma, estudos vêm sendo realizados com o intuito de obter diferentes proteínas inseticidas.

Ureases (EC 3.5.1.5) são enzimas dependentes de níquel, amplamente distribuídas, podendo ser encontradas em plantas, bactérias e fungos. Sua função nos vegetais parece estar relacionada a processos de metabolização de nitrogênio, principalmente nos processos germinativos. Porém, seu papel fisiológico em vegetais não é completamente esclarecido, principalmente em relação a presença de isoformas desta enzima. A soja (*Glycine max*) possui duas isoformas, a urease metabólica ou ubíqua, presente em todos os tecidos da planta em concentrações bem menores (0,1 a 1%) em relação à urease denominada embrião-específica, que é sintetizada apenas no embrião em formação, e acumulada na semente madura, possuindo atividade ureásica 1000 vezes superior à ubíqua (POLACCO e WINKLER, 1984; TORISKY e POLACCO, 1990). Estudos de mutantes para estas enzimas indicaram que a urease ubíqua está envolvida em processos de reciclagem da uréia, pois mutantes com silenciamento desta isoforma apresentaram anormalidades, como retardamento da germinação, acúmulo de uréia nas folhas e necroses pontuais nas folhas e raízes (STEBBINS *et al.*, 1991). Mutantes com silenciamento da urease embrião-específica, por sua vez, não demonstraram qualquer anormalidade. Este estudo despertou dúvidas sobre a função desta isoforma de urease na semente, pois não estaria envolvida em processos ligados à assimilação de uréia, podendo participar de outros processos na planta, como defesa.

Nosso grupo descreveu a presença de isoformas de urease em *Canavalia ensiformis*, uma leguminosa com elevada resistência ao ataque de insetos, além da urease clássica (JBURE-I) anteriormente descrita. Esta isoforma, denominada Canatoxina (CNTX), foi testada oralmente

contra diferentes espécies de insetos pertencentes a diferentes ordens (CARLINI *et al.*, 1997): *Manduca sexta*, (lagarta do tabaco); *Schistocerca americana*, Orthoptera (gafanhoto); *Oncopeltus fasciatus*, Hemíptera (joaninha); *Drosophila melanogaster*, Díptera (mosca da fruta); *Callosobruchus maculatus*, Coleóptera (caruncho do feijão de corda); *Aedes aegypti*, Díptera (mosquito da febre amarela); *Rhodnius prolixus*, Hemíptera (vetor da Doença de Chagas), *Dysdercus peruvianus* (percevejo manchador da maçã do algodoeiro). Observou-se letalidade da toxina contra *Callosobruchus maculatus*, *Rhodnius prolixus* e *Dysdercus peruvianus*. Os demais insetos não apresentaram sinais de toxicidade, mesmo após ingerirem grandes quantidades da proteína. Em insetos susceptíveis a CNTX, o sistema digestivo é baseado em enzimas proteolíticas ácidas, do tipo catepsinas, enquanto os demais, que foram resistentes, têm digestão básica, baseada em enzimas tipo tripsina.

Posteriormente, demonstrou-se que a administração de CNTX juntamente com inibidores de catepsinas, como pepstatina A ou E-64 aumentava o índice de sobrevivência de *R. prolixus* tratados com CNTX, indicando que esta é ativada proteoliticamente no trato gastrointestinal dos mesmos (CARLINI *et al.*, FERREIRA-DASILVA, *et al.*, 2000). Neste estudo, foi realizada digestão in vitro da Canatoxina com enzimas obtidas da larva do besouro *C. maculatus*. Obteve-se assim, um conjunto de peptídeos (10-15 kDa) tóxicos quando injetados ou ingeridos pelos barbeiros (*R. prolixus*) (FERREIRA-DASILVA, *et al.*, 2000). Procedeu-se à purificação do peptídeo mais ativo (10 kDa), denominado pepcanatox, através de processos cromatográficos clássicos (patente INPI-RS 0003334, de 6 de junho de 2000).

Paralelamente, foi clonado o gene de uma isoforma de urease a partir de *C. ensiformis* e denominada JBURE-II, que codifica uma sequência polipeptídica predita com elevada identidade (86%) em relação a JBURE-I, a urease clássica (PIRES-ALVES *et al.*, 2003).

Desta forma, tornou-se possível proceder à clonagem de um segmento de cDNA de JBURE-II, a partir de informações da sequência peptídica do Pepcanatox, visando obter a expressão heteróloga do peptídeo recombinante (Jaburetox-2Ec) em células de *Escherichia coli*. Após otimização das condições de expressão e purificação do peptídeo recombinante, foram realizados bioensaios contra insetos-praga, a fim de verificar a atividade inseticida do mesmo.

MATERIAL E MÉTODOS

A partir da sequência N-terminal do pepcanatox, desenhamos iniciadores para a amplificação por PCR de um fragmento de 270 pb, correspondente ao pepcanatox, a partir do gene de JBURE-II, que foi denominado *jaburetox-2Ec*. Este foi clonado no vetor de expressão pET 101 (Invitrogen) em fusão com um epitopo V-5 e seis histidinas na extremidade C-terminal do peptídeo, sob o controle do promotor T7, contendo o operador *lac*.

O vetor pET101/*jaburetox-2Ec* foi introduzido por eletroporação em células de *Escherichia coli* (BL21 star) e a produção heteróloga de Jaburetox-2Ec recombinante foi induzida com adição de IPTG ao meio de cultura da bactéria recombinante. As células foram ressuspensas em tampão fosfato e sonificadas. Após centrifugação, o sobrenadante foi submetido a cromatografia de afinidade a Ni (Ni-NTA) e o peptídeo purificado foi utilizado no bioensaio contra o hemíptero *Dysdercus peruvianus*. Ninfas de 2º estágio foram alimentadas com dietas de farinha de algodão contendo Jaburetox-2Ec 0,02% m/m e a mortalidade foi observada diariamente. Foram também realizados ensaios contra baratas *Blattella germanica*, utilizando dieta de ração para gatos contendo 0,1% m/m de Jaburetox-2Ec. A expressão e purificação foi acompanhada por SDS-PAGE e o western blot foi realizado utilizando-se anticorpos anti-CNTX produzidos em coelhos e anti-IgG de coelho com fosfatase alcalina conjugada como anticorpo secundário.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Expressão e Purificação de Jaburetox-2Ec

A expressão do peptídeo recombinante foi acompanhada por SDS-PAGE, observando-se o aparecimento da banda diferencial de 13 kDa nas células induzidas com IPTG em relação ao controle (não induzido), que não possui esta proteína (Fig 1). Após diversos ensaios para aumentar os níveis de expressão do peptídeo, observou-se que o maior rendimento obtido foi a partir da indução com 1 mM de IPTG durante 2h a 37° C.

Desta forma, foi possível purificar Jaburetox-2Ec a partir das células de *E. coli* em condições nativas (Fig. 2). O reconhecimento do peptídeo pelos anticorpos anti-CNTX (Fig. 3) indicam que o peptídeo foi corretamente traduzido, mantendo determinantes antigênicos desta proteína.

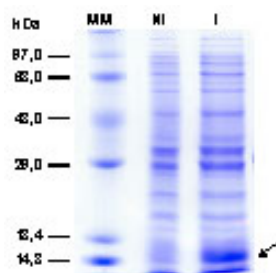


Fig. 2. Purificação de Jaburetox-2Ec.
MM: Marcador de massa molecular
NI: Células não induzidas com IPTG
I: Células induzidas com IPTG

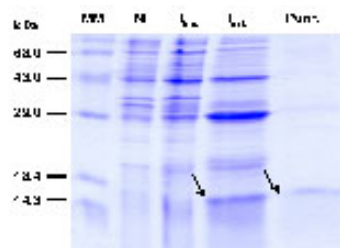


Fig. 3. Western blot de Jaburetox-2Ec.
PWT: Western blot de proteína total
NI: Células não induzidas com IPTG
I: Células induzidas com IPTG
Purified: Jaburetox-2Ec purificado com NTA

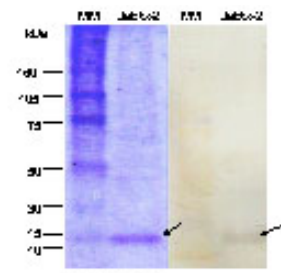


Fig. 4. Western blot de Jaburetox-2Ec.
PWT: Western blot de proteína total
NI: Células não induzidas com IPTG
I: Células induzidas com IPTG

O rendimento final da expressão heteróloga de Jaburetox-2Ec em *E. coli* foi significativo. Após ajustes nas condições de expressão, permitiu obtenção de aproximadamente 6 mg de Jaburetox-2Ec puro por litro de cultura, em condições nativas.

Ensaios de Atividade Entomotóxica de Jaburetox-2Ec

A elevada toxicidade de Jaburetox-2Ec contra *D. peruvianus* observada neste trabalho (Fig. 4) reforça a hipótese de que as ureases vegetais podem estar relacionadas a defesa de plantas e corrobora o mecanismo proposto para liberação do peptídeo tóxico Pepcanatox a partir de Canatoxina, estabelecido anteriormente (CARLINI *et al.*, 1997; FERREIRA-DASILVA *et al.*, 2000). Jaburetox-2Ec, por sua vez, foi obtido de uma terceira isoforma de urease encontrada em *C. ensiformis*, indicando que o processamento destas proteínas no intestino de insetos e liberação de fragmentos protéicos tóxicos pode ser comum a outras ureases. A ativação proteolítica no intestino de insetos já foi demonstrada em outras proteínas inseticidas. As pró-toxinas Cry sofrem um processo de hidrólise no intestino dos insetos susceptíveis (RUKMINI *et al.*, 2000), uma etapa envolvida não somente na ativação da pró-toxina, como na especificidade de ação, assim como demonstrado para as ureases vegetais.

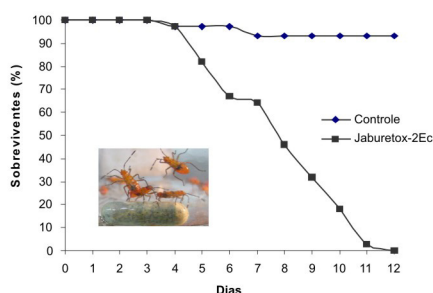


Fig. 4. Ensaio de toxicidade contra insetos *D. peruvianus*. 30 ninfas de segundo estágio foram alimentadas com dieta de farinha de algodão, contendo 0,02% (m/m) de Jaburetox-2Ec purificado.

Por outro lado, a atividade inseticida de Jaburetox-2Ec contra *B. germanica* (Fig. 5) mostra que este segmento de urease é tóxico para um inseto com digestão baseada em enzimas do tipo tripsina, que não seriam suscetíveis a urease completa. Este resultado confirma a hipótese de que a espécie-especificidade das ureases como inseticidas seria dada pelo tipo de digestão e aparato enzimático do inseto, sendo limitada pela formação do peptídeo tóxico, que neste caso, não é necessária, aumentando o espectro de ação do peptídeo em relação à urease inteira. Assim, a presença de “receptores” para estes fragmentos de urease e a suscetibilidade aos efeitos tóxicos parece ser uma característica mais amplamente compartilhada na classe Insecta.

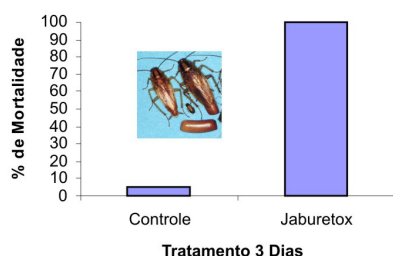


Fig. 5. Ensaio de toxicidade contra insetos *B. germanica*. 30 insetos de primeiro estágio foram alimentados com dieta baseada em ração para gatos, contendo 0,1% (m/m) de Jaburetox-2Ec.

PERSPECTIVAS

A produção de Jaburetox-2Ec recombinante facilitará futuros estudos de relação entre estrutura, atividade e função das ureases, mecanismo de ação dos peptídeos, espectro de atividade, estrutura tridimensional, toxicidade em mamíferos, entre outros.

A toxicidade de Jaburetox-2Ec contra insetos como *B. germanica* e *D. peruvianus* desperta grande interesse no estudo deste peptídeo como um potencial bioinseticida doméstico e/ou agrícola, bem como um gene de interesse para introdução em plantas, visando resistência contra insetos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CARLINI, C. R.; OLIVEIRA, A. E.; AZAMBUJA, P.; XAVIER-FILHO, J. & WELLS, M. A. Biological effects of canatoxin in different insect models: evidence for a proteolytic activation of the toxin by insect cathepsin-like enzymes. **Journal of Economic Entomology**, v.90, p. 340-348, 1997.
- FERREIRA-DASILVA, C.T.; GOMBAROVITS, M. E. C.; MASUDA, H.; OLIVEIRA, C. M.; CARLINI, C. R. Proteolytic activation of canatoxin, a plant toxic protein, by insect cathepsin-like enzymes. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 44, n. 4, 162-171, 2000.
- FERREIRA-DASILVA, C.T. Efeitos da CNTX e peptídeos derivados sobre diferentes insetos: uma proposta de bioinseticida. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil, 2002.
- PIRES-ALVES, M.; GROSSI-DE-SÁ, M. F.; BARCELLOS, G. B. S.; CARLINI, C. R. & MORAES, M. G. Characterization and expression of a novel member (JBURE-II) of the urease gene family from jackbean [*Canavalia ensiformis* (L.) DC]. **Plant Cell Physiology**, v, 44, n. 2, p. 139-145, 2003.
- POLACCO, J. C. & WINKLER, R. G. Soybean leaf urease: a seed enzyme? **Plant Physiology**, v.74, p. 800-803, 1984.
- RUKMINI, V.; REDDY, C. Y. & VENKATESWERLU, G. *Bacillus thuringiensis* crystal endotoxin: role of proteases in the conversion of protoxin to toxin. **Biochimie**, v. 82, p. 109-116, 2000.
- STEBBINS, N. E.; HOLLAND, M. A.; CIANZIO, S. R. & POLACCO, J. C. Genetic tests of the roles of the embryonic ureases of soybean. **Plant Physiology**, v.97, p.1004–1010, 1991.
- TORISKY R. S. & POLACCO, J. C. Soybean roots retain the seed urease isozyme synthesized during embryo development. **Plant Physiology**, v. 94, p. 681–689, 1990.

14 - PEPTÍDEOS DE SEMENTES DE MARACUJÁ (*Passiflora edulis*): UMA NOVA ESTRATÉGIA NO CONTROLE DE FUNGOS FILAMENTOSOS

Pelegrini, P.B.¹; Moreira, I.C.¹; Bloch Jr., C.²; Noronha, E.F.¹ e Franco, O.L.¹

¹Universidade Católica de Brasília; ² Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

RESUMO

Um dos maiores problemas observados na agricultura é a severa perda econômica causada por infecções por fungos fitopatogênicos. Diversos estudos têm relatado a presença de proteínas com atividade antifúngicas em plantas. Dentre estas proteínas de defesa estão as defensinas de plantas, as quais se caracterizam por serem catiônicas, apresentarem baixa massa molecular e cerca de 3 a 4 ligações dissulfeto que estabilizam sua estrutura terciária. Neste trabalho, peptídeos de sementes de maracujá (*Passiflora edulis*) foram purificados usando cromatografia em coluna de Red-Sepharose CI-6B seguido por cromatografia de fase reversa HPLC (Vydac C18-TP). Os peptídeos isolados demonstraram capacidade de inibir o crescimento de fungos filamentosos como *Trichoderma harzianum*, *Fusarium oxysporum* e *Aspergillus fumigatus*. As massas moleculares dos peptídeos de maracujá foram analisadas por SDS-PAGE e espectrometria de massa (MALDI-TOF), mostrando um peptídeo isolado de 5.336,79 Da. Estas análises mostraram que este peptídeo provavelmente pode, através de sua massa molecular, ser classificado dentro do grupo das defensinas. Este estudo propõe a obtenção de proteínas de sementes de maracujá por técnicas de proteômica que, no futuro, possam contribuir para o desenvolvimento de plantas transgênicas resistentes a diferentes fitopatógenos.

INTRODUÇÃO

Defensinas de plantas são pequenas proteínas catiônicas e ricas em ligações dissulfeto que apresentam a capacidade de inibir o crescimento de fungos filamentosos. Estas proteínas são normalmente isoladas das sementes de plantas, podendo também ser encontrada em folhas e flores (Thevissen *et al*, 2000; Lay *et al*, 2003; Fujimura *et al* 2004). O mecanismo de ação das defensinas ainda não é conhecido definitivamente, mas hipóteses já descritas indicam que estes peptídeos possam atuar por meio de ligação com glicoproteínas presentes na membrana das células fúngicas, causando a despolarização e morte celular (Thevissen, *et al*, 2004). O seguinte estudo apresenta a caracterização de um peptídeo com massa molecular semelhante ao grupo das defensinas, isolado de sementes de maracujá (*Passiflora edulis*) que demonstrou atividade biológica contra fungos filamentosos.

MATERIAL E MÉTODOS

Extração e Isolamento de defensinas de P. edulis

As sementes de maracujá (*Passiflora edulis*) foram trituradas e suas proteínas extraídas utilizando tampão Tris-HCl 0,15 M (1:3 m/v). Este extrato foi centrifugado e o sobrenadante submetido à precipitação com sulfato de amônio (0-100%). Após a precipitação, o material foi centrifugado a 5000 rpm por 20 minutos a 4°C sendo o precipitado colocado em diálise contra água destilada. Após nova centrifugação, o sobrenadante foi liofilizado. A fração precipitada com sulfato de amônio foi aplicada em coluna de Red-Sepharose equilibrada com tampão Tris-HCl 0,15 M contendo CaCl₂ a 5,0 mM. O pico não retido foi lavado com o mesmo tampão usado para equilibrar a coluna e o pico retido foi eluído com tampão Tris-HCl contendo NaCl 3,0 M. Após a diálise e liofilização, 1,0 mg da fração de pico retido foi dissolvida com ácido trifluoracético a 0,1% em cromatografia de fase reversa em coluna analítica de HPLC (Vydac C-18TP) e as proteínas retidas foram eluídas com um gradiente linear de acetonitrila (0-100%).

Análise por espectrometria de massa (MALDI-TOF)

Os picos obtidos na HPLC foram analisados por espectrometria de massa (MALDI-TOF) de acordo com Franco *et al.* (2000).

Bioensaio contra fungos filamentosos

Os testes contra fungos filamentosos foram feitos de acordo com Oard *et al.* (2004). Para o bioensaio foram utilizados os organismos das espécies *T. harzianum*, *A. fumigatus*, *F. oxysporum* e *R. solani*. Os respectivos organismos foram colocados em 20ml de meio MYG (extrato de malte 0,5%; extrato de levedura 0,25%; glicose 1,0%; pH 6,0) por 48 horas a 25° C junto com amostras de pico retidos e provenientes de cromatografia de fase-reversa (HPLC) de sementes de maracujá (*P. edulis*). Água destilada foi adicionada como controle negativo e capitan 0.5%, como controle positivo. A avaliação da inibição do crescimento foi dada pela medida de peso seco dos fungos após 48 horas de incubação e comparação com os controles.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Objetivando identificar proteínas anti-fúngicas em sementes de maracujá (*P. edulis*), um pico retido foi obtido na coluna de Red-Sepharose (Figura 1A). Este pico apresentou diferentes proteínas com massa molecular diferentes, quando analisado por SDS-PAGE e MALDI-TOF.

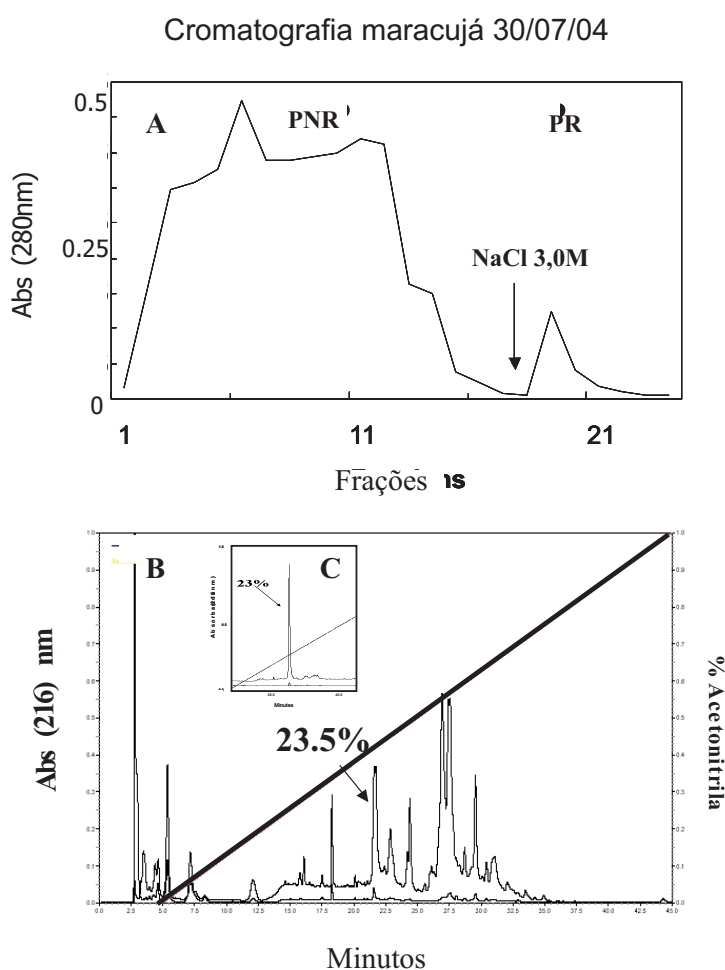


Figura 1. Purificação de defensinas de sementes de maracujá (*P. edulis*) utilizando (A) cromatografia em coluna de Red-Sepharose CI-6B seguida por (B) uma cromatografia de fase-reversa em coluna analítica (Vydac C-18TP) e (C) re-cromatografia na mesma coluna. As linhas diagonais indicam um gradiente linear de acetonitrila. PNR corresponde aos picos não-retidos e PR, aos picos retidos. As setas indicam (A) eluição inicial das proteínas absorvidas usando tampão Tris-HCl contendo NaCl 3,0 M e (B e C) valores de porcentagem indicam a concentração de acetonitrila envolvida na eluição do pico majoritário.

Com o intuito de incrementar a purificação destas proteínas, o pico retido da Red-Sepharose foi aplicado em coluna de fase reversa (HPLC) revelando a presença de um pico majoritário eluído com 23,5% de acetonitrila (Figura 1B e 1C). Este pico foi submetido a uma nova cromatografia para posterior análise de massa molecular por espectrometria de massa revelando um peptídeo purificado de 5.336, 79 Da (Figuras 2)

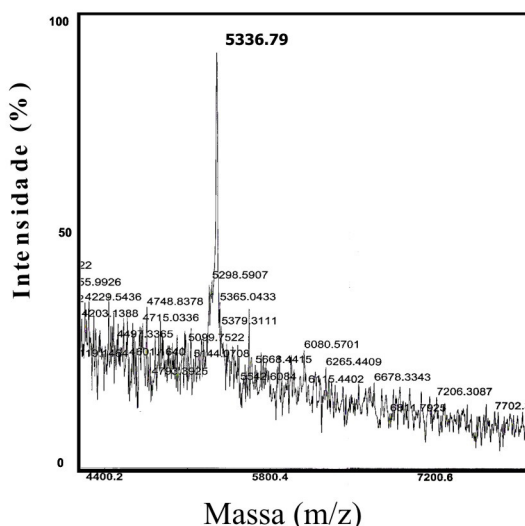


Figura 2. Espectro de massa do pico indicado de HPLC proveniente das proteínas de maracujá (*P. edulis*).

As proteínas presentes do pico retido foram utilizadas para o desenvolvimento de bioensaios em meio líquido, revelando um efeito bacteriostático contra os fungos filamentosos *T. harzianum*, *A. fumigatus* e *F. oxysporum*, mas nenhum efeito contra *R. solani* (Figura 3A). O peptídeo isolado por HPLC foi testado separadamente contra o fungo *T. harzianum* mostrando que, sozinho, este peptídeo é capaz de mostrar efeito bacteriostático (Figura 3B). Estudos anteriores têm revelado a presença de outros peptídeos, como os isolados de bulbos de tulipa (*Tulipa gesneriana* L.), também semelhantes as defensinas, os quais apresentam atividade contra fungos filamentosos como o *F. oxysporum* (Fujimura *et al.*, 2004). O mecanismo de ação de proteínas de defesa de plantas contra fungos filamentosos e leveduriformes, dentre eles espécies de *Fusarium* sp e *Neurospora* sp., vem sendo estudado efetivamente, uma vez que somente hipóteses foram relatadas até o momento, onde as defensinas seriam capazes de se ligar a glicoproteínas presentes na membrana das células dos patógenos, proporcionando a formação de poros e, conseqüentemente, saída de íons bivalentes (Spelbink. *et al.* 2004; Thevissen *et al.* 2004).

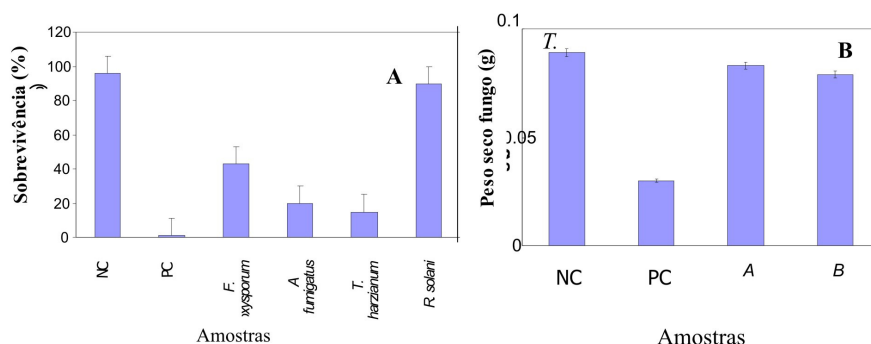


Figura 3. Bioensaio com fungos usando (A) Picos retidos obtidos da Red-Sepharose Cl-6B e (B) Frações de HPLC indicadas de sementes de maracujá (*P. edulis*). Os testes A e B indicam concentrações de proteínas antimicrobianas de 2.5% e 5.0% (w:v) respectivamente. Água destilada foi usada como controle negativo e capitan 0,5%, como controle positivo.

Portanto, a descoberta de um novo peptídeo capaz de inibir o crescimento de fungos filamentosos pode trazer, futuramente, maiores descobertas sobre o modo de ação destas proteínas. Além disso, a presença de defensinas antifúngicas em sementes de maracujá pode ser uma nova ferramenta no controle de fitopatógenos e no desenvolvimento de bioinseticidas, através de engenharia genética.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- FRANCO, O L.; RIDGEN, D. J.; MELO, F. R.; BLOCH Jr., C.; SILVA, C. P.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Activity of wheat alpha-amylase inhibitors towards bruchid alpha-amylases and structural explanation of observed specificities. **European Journal of Biochemistry**, v.267, p. 2166-2173, 2000.
- FUJIMURA, M.; IDEGUCHI, M.; MINAMI, Y.; WATANABE, K.; TADERA, K. Purification, Characterization, and Sequencing of Novel Antimicrobial Peptides, *Tu*-AMP 1 and *Tu*-AMP 2, from Bulbs of Tulip (*Tulipa gesneriana* L.). **Bioscience of Biotechnology and Biochemistry**, v.68, n.3, 571-577, 2004.
- LAY, F. T.; BRUGLIERA, F.; ANDERSON, M. A. Isolation and Properties of Floral Defensins from Ornamental Tobacco and Petunia. **Plant Physiology**, v.131, p.1283-1293, 2003.
- OARD, S.; RUSH, M. C.; OARD, J. H. Characterization of antimicrobial peptides against a US strain of the rice pathogen *Rhizoxtonia solani*. **Journal of Applied Microbiology**, v.97, p.169-180, 2004.
- SPELBRINK, R. G.; DILMAC, N.; ALLEN, A.; SMITH, T. J.; SHAH, D. M. Differential Antifungal and Calcium Channel-Blocking Activity among Structurally Related Plant Defensins. **Plant Physiology**, v.135, p.1-13, 2004.
- THEVISSSEN, K.; CAMMUE, P. A.; LEMAIRE, K.; WINDERICK, J.; DISCKSON, R. C.; LESTER, R. L.; FERKET, K. K. A.; EVEN, F. V.; PARRET, A. H.; BROKAERT, W. F. A gene encoding a sphingolipid biosynthesis enzyme determines the sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to an antifungal plant defensin from dahlia (*Dahlia merckii*). **Proceeding of the National Academy of Sciences**, v.97, n.17, p.9531-9536, 2000.
- THEVISSSEN, K.; WARNECKE, D. C.; FRANCOIS, I. E.; LEIPELT, M.; LEINZ, E.; OTT, C.; ZAHRINGER, U.; THOMMA, B. P.; FERKET, K. K.; CAMMUE, B. P. Defensins from insects and plants interact with fungal glucosylceramides. **Journal of Biololy and Chemistry**, v. 279, p. 3900-3905, 2004.

15 - BUSCA DE GENES DE RESISTÊNCIA EM *ARACHIS* SILVESTRE

Guimarães, P.M.¹; Leal-Bertioli, S.¹; Fávero, A.¹; Valls, J.F.M.¹; Morethzohn, M.¹ e Bertioli, D.J.²

¹EMBRAPA – Recursos Genéticos e Biotecnologia ;² Universidade Católica de Brasília, UCB.

RESUMO

O gênero *Arachis* possui cerca de 80 espécies, todas nativas da América do Sul. Inclui o amendoim cultivado, *A. hypogaea* L., uma leguminosa importante por ser rica em óleo e proteína. No entanto, é uma espécie muito susceptível a várias doenças e pragas. Espécies silvestres de *Arachis* têm-se mostrado altamente promissoras como fonte de resistência a diversas pragas que atingem o amendoim e outras culturas, sendo que já foram identificadas algumas espécies com resistência aos fungos foliares *Cercospora arachidicola*, *C. personatum* e *Puccinia arachidis* e aos nematóides das galhas *Meloidogyne arenaria* e *M. javanica*. Para a maioria das culturas, a caracterização de genes de resistência tem se concentrado apenas em genes que já foram introgridos em plantas cultivadas, sendo que até o momento, poucos genes oriundos de germoplasma silvestre foram caracterizados. Para que se possa explorar estas fontes de resistência eficientemente, se faz necessário o isolamento e caracterização destes genes de resistência para sua utilização em biotecnologia. A busca de genes de resistência em *Arachis* silvestre tem sido realizada através de quatro principais estratégias: desenvolvimento de mapas genéticos das espécies silvestres e correlação de marcadores moleculares com resistências às pragas; identificação de análogos a genes de resistência (RGAs); identificação de ESTs relacionados à interação planta-patógeno e genômica comparativa com *Lotus japonicus*. Até o momento, dois mapas genéticos (genoma AA e BB) baseados principalmente em marcadores microssatélites e alguns marcadores gênicos (RGAs, ESTs e marcadores-âncora) estão sendo finalizados e bioensaios com a F₂ visando a inclusão de resistência a fungos e nematóides no mapa estão sendo realizados; 78 RGAs já foram isolados e estão sendo caracterizados e transformados em marcadores moleculares via *Southern-blot* e *RGA-display* e cerca de nove marcadores-âncora com *Lotus japonicus* já foram mapeados, possibilitando estudos de sintonia. Além disso, cinco bibliotecas de cDNA de *Arachis stenosperma* (resistente a fungos e nematóides) sob diferentes *stress* foram construídas e estão sendo seqüenciadas visando a análise da expressão diferencial de seqüências que será realizada “in silico” e através de macroarranjos.

INTRODUÇÃO

O amendoim é a quarta maior cultura oleaginosa mundial, sendo importante fonte de óleos e proteína. *Arachis hypogaea* é susceptível a várias doenças tanto no Brasil quanto em todo resto do mundo. Entre as principais doenças estão os nematóides das galhas, *Meloidogyne arenaria* e *M. javanica* e fungos foliares como: *Cercospora arachidicola* Hori (Mancha parda ou *Early leafspot*); *Cercosporidium personatum* (Berk. e Curt.) Deighton (Mancha preta ou *Late leafspot*).

Devido à estreita base genética de espécies cultivadas, germoplasma silvestre é uma importante fonte na busca de genes de resistência para incorporação em cultivares de importância econômica. A EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia possui um banco de germoplasma silvestre de *Arachis*, com mais de 1000 acessos de espécies silvestres, algumas das quais já identificadas como fontes de resistência para nematóides e fungos foliares (Nelson *et al.*, 1989) (Fig. 01). Recentemente, um grande número de genes de resistência para diferentes patógenos foi clonado (Boyes *et al.*, 1998, Dixon *et al.*, 1998, Wang *et al.*, 1999, Yoshimura *et al.*, 1998). Estes genes de resistência podem ser agrupados pela similaridade em sua seqüência de aminoácidos e apresentam regiões comuns. O

maior grupo de genes de resistência codifica para proteínas com o que se supõe ser uma região para ligação de nucleotídeos (NBS) no N-terminal, assim como uma região com repetições de leucina (LRR) no C-terminal. Primers foram construídos para a região NBS e o produto de tradução putativo indica similaridade com genes de resistência conhecidos (Fig. 2). Estes fragmentos são chamados análogos de genes de resistência (RGAs) que, em alguns casos, estão ligados a genes de resistência (Aarts *et al.* 1998, Collins *et al.* 1998, Kanazin *et al.* 1996, Shen *et al.* 1998, Yu *et al.* 1996), indicando que uma proporção destas regiões constituem partes de genes de resistência funcionais.

Uma outra espécie da família das leguminosas, *Lotus japonicus*, tem um genoma bem menor, tem um mapa genético de alta resolução já disponível e os projetos de seqüenciamento de ESTs (expressed sequenced tags) e do genoma estrutural estão quase completos (Asamizu *et al.*, 2000; Sato *et al.*, 2001). Por isso, *L. japonicus* tem sido considerada uma das planta-modelo para leguminosas, auxiliando no entendimento de outras espécies de genoma mais complexos. A comparação entre estes dois gêneros e a análise da ordem dos genes nos cromossomos possibilita a identificação de regiões correlatas entre os dois genomas (chamada sintonia), ou seja, o mapeamento comparativo. Neste processo, são identificados marcadores moleculares comuns aos diversos genomas, chamados marcadores-âncoras.

Uma outra estratégia ainda, pode ser a geração de ESTs (Expressed Sequence Tags). ESTs são seqüências curtas de DNA produzidas a partir de clones de cDNA escolhidos aleatoriamente e seqüenciados uma única vez (Gautheret *et al.*, 1998). Além de serem amplamente explorados na identificação de genes novos, vêm também sendo utilizados para a criação de extensos catálogos de genes (Gautheret *et al.*, 1998 e Zafar *et al.*, 2002).

A identificação e isolamento de genes de resistência de germoplasma silvestre visam a futura transferência destes genes para o amendoim cultivado, *A. hypogaea* através de melhoramento tradicional ou para outras espécies de interesse comercial, como a soja ou o feijão, através de transformação genética. Vários trabalhos demonstram que genes de resistência podem manter sua atividade quando transferidos para outras espécies (Rommens *et al.*, 1995, Thilmony *et al.*, 1995, Hammond-Kosack *et al.*, 1998).

MATERIAL E MÉTODOS

Banco de ESTs

O primeiro banco de dados de seqüências de *Arachis* está sendo criado a partir de ESTs gerados de bibliotecas de cDNA de folhas inoculadas com *Cercospora arachidicola* e raízes inoculadas com *Bradirhizobium* e *Meloidogyne arenaria*.

Marcadores RGAs

Para a utilização de RGAs como sondas para *Southern Blot*, escolheu-se seqüências representativas de cada clade (Bertioli, 2000). Inicialmente, foram feitos testes-piloto para se avaliar o polimorfismo de cada RGA nos parentais e em seguida na população inteira F2. Uma segunda estratégia, chamada AFLP ancorado, combina as características de AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism, Vos *et al.*, 1995) e S-SAP (Sequence-specific amplification polymorphism, Waugh *et al.*, 1997). DNA genômico é clivado com uma única enzima de restrição que gera fragmentos de 300-400bp. Depois, um adaptador com um braço longo e um braço curto é ligado aos terminais destes fragmentos. Um primer desenhado para um motivo de interesse (neste caso, o motivo Kinase-2, presente em genes de resistência) é utilizado juntamente com um primer específico para o adaptador (AP1) em uma reação de PCR. Os produtos amplificados são resolvidos em um gel de poliácridamida corado com prata, de acordo com Creste *et al.* (2001) e seqüenciados para confirmação da identidade.

Marcadores-âncora

A exploração da colinearidade entre genes de *Arachis* e *Lotus* buscando a identificação de regiões cromossômicas ortólogas (genes homólogos localizados em genomas de diferentes organismos) tem sido realizada através de um “pipeline” desenvolvido pela Universidade de Aarhus: inicialmente identifica-se ESTs conservados em três espécies de leguminosas (*Lotus*, *Medicago* e *Glycine*) que apresentam apenas um homólogo em *Arabidopsis*, faz-se a identificação desta sequência no DNA genômico desta espécie na busca de *introns* para desenho de *primers* para suas bordas. Uma vez identificadas as sequências faz-se a seleção daqueles *primers* que geram polimorfismos entre as espécies parentais contrastantes para resistência em *Arachis* e faz-se sua aplicação na F₂.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Até o momento, o banco de dados de ESTs de *Arachis* contém 2700 sequências oriundas de uma biblioteca de cDNA de folhas da espécie silvestre, *A. stenosperma*, e de duas outras bibliotecas geradas a partir de raízes desta espécie infectadas e não-infectadas com *Rhizobium* spp. Outras duas bibliotecas produzidas a partir de cDNA de raízes de *A. stenosperma* infectada e não infectada com *Meloidogyne javanica* e uma biblioteca subtrativa de *A. stenosperma* inoculada com *Cercospora personatum* estão sendo sequenciadas. Algumas das sequências já apresentaram homologia com proteínas envolvidas no processo de patogenicidade de alguns organismos e plantas e terão seu perfil de expressão analisado através de experimentos de macroarranjos. A continuação do sequenciamento das diferentes bibliotecas possibilitará a análise da expressão diferencial de genes expressos em respostas aos diferentes estímulos (stress biótico). A identificação de genes, principalmente os de resistência é um dos grandes objetivos deste projeto. Este banco de ESTs permitirá a comparação de similaridades de sequências a genes já conhecidos sugerindo assim sua função (Matthews *et al.*, 2001). Além disso, estes clones de cDNA poderão ser mapeados assim como clones genômicos têm sido mapeados. O mapeamento dos clones de cDNA indica a posição dos genes, que podem ser correlacionadas com fenótipos. Assim, a associação de marcadores gerados pelo clone de cDNA com fenótipos pode aumentar o entendimento ou o relacionamento com as vias e mecanismos bioquímicos que afetam características agronômicas como resistência (Matthews *et al.*, 2001). A análise da expressão gênica diferencial possibilitará a identificação de genes cuja expressão é modificada durante desafio com o patógeno, mas cuja genética é muito complexa, mas cujo nível de expressão determina resistência ou suscetibilidade (Ellingboe, 2000).

A conversão de sequências RGAs em marcadores moleculares foi realizada através de diferentes estratégias: AFLP ancorado, onde foram obtidas 18 bandas polimórficas, das quais 8 comprovaram-se RGAs, sendo duas alélicas, já mapeadas na F₂, e *Southern-blot* onde cerca de doze clones já foram identificados como polimórficos em relação aos parentais, e estão sendo mapeados na F₂. Durante este período, também se construiu uma biblioteca genômica de *A. stenosperma*, visando o isolamento das sequências completas (possivelmente associadas a genes de resistência) destes RGAs. Devido à similaridade com genes de resistência os RGAs podem ser partes de genes de resistência ou estarem ligados a eles, uma vez que o mapeamento de sequências de RGAs de várias espécies demonstrou a sua ocorrência em “clusters” que contém membros de uma mesma família gênica incluindo genes de resistência funcionais (Kanazin *et al.*, 1996, Shen *et al.*, 1998). Portanto, esse marcador tem demonstrado ampla aplicabilidade quando se trata de identificação de genes de resistência. Portanto, a caracterização de RGAs em *Arachis* sem dúvida contribuirá significativamente para a identificação de genes para diferentes doenças e pestes que afetam o amendoim cultivado. Além destas sequências serem importantes por estarem potencialmente ligadas a genes de resistência, também servirão

como sondas em experimentos de FISH para o desenvolvimento de um mapa físico de *Arachis*.

A análise genômica comparativa poderá auxiliar no desenvolvimento de marcadores para o melhoramento genético da cultura, o que certamente facilitará a clonagem de genes de interesse. Até agora, de várias seqüências gênicas oriundas de *Lotus japonicus*, nove se mostraram polimórficas em *Arachis* sendo que cinco já foram totalmente mapeadas na nossa F2. A exploração da colinearidade entre genes de *Arachis* e *Lotus* buscando a identificação de regiões cromossômicas ortólogas (genes homólogos localizados em genomas de diferentes organismos) possibilitará comparações com diversos legumes, e a inclusão do amendoim em um sistema genético único, o que possibilitará que o projeto se beneficie de descobertas de genes realizadas em outras culturas, especialmente leguminosas.



Figura1: Bioensaio de fungos e nematóides utilizando variedades silvestres e cultivadas de *Arachis*. A) *Meloidogyne javanica* B) *Cercospora arachidicola*.

Clonagem de RGAs usando 'motifs NBS'

51						100
RUST	EMLSLDSKSV	TMVGLYGMGG	IGKTTTAKAV	YNKISSHFDR	CCFVDN...V	
L6	EKLSLDSENV	TMVGLYGMGG	IGKTTTAKAV	YNKISSCFDC	CCFIDN...I	
N	SLLEIGINGV	RIMGIWGMGG	VGKTTIARAI	FDTLGRMDS	SYQFDGACFL	
NL25	SLLEMESGDV	RILGIWGMGG	VGKTTLARAV	FDTL.....	SPRFQYASFL	
PS5	NRLMED...GS	GILGLYGMGG	VGKTTLLTKI	NNKFSKIDDR	...FDVVIWV	
RPS2	NTLMKD...GF	KIMGLYGMGG	VGKTTLLTQI	NKKFSETDGG	...FDIVMWV	
MI-1	RKLTSGPADL	DVISITGMPG	SGKTTLAYKV	YND.KSVSRH	...FDLRAWC	
RPP8	GHLVENDVH.	QVVSIAGMGG	IGKTTLARQV	FHH.DLVRRH	...FDGFAWV	
		****	*****			
		MOTIF				

Tra dução reversa

P1a: GGIATGCCIG GIIIIGGIAA RACIAC
P1b: GGIATGGGIG GIIIIGGIAA RACIAC

(Primers)

Figura 2: Seqüência dos genes de resistência utilizados no desenho dos primers para isolamento de RGAs de *Arachis*.

PERSPECTIVAS

A busca de genes de resistência em parentes silvestres de amendoim auxiliará os programas de melhoramento de amendoim especialmente quanto à resistência a pragas e patógenos (uma vez que os genes de resistência estão normalmente agrupados no cromossomo), acelerando os trabalhos de melhoramento tradicional, beneficiando diretamente os produtores desta cultura. Além disso, através da transformação genética, outras culturas, especialmente as leguminosas (feijão, soja, ervilha, etc) poderão se beneficiar da introdução destes genes. Além disso, os dados que estão sendo gerados em relação aos marcadores e genes expressos diferencialmente e prospecção de genes em germoplasma silvestre beneficiarão projetos envolvendo interação planta-patógeno e caracterização e avaliação de recursos genéticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARTS, N.; HEKKERT, B..L.;;HOLUB, E.; BEYNON, J.L.; STEKEMA, W.J.; PEREIRA, A. Identification of R-gene homologous DNA fragments genetically linked to disease resistance loci in *Arabidopsis thaliana*. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v. 11, p. 251-258, 1998.
- ASAMIZU, E., NAKAMARA, Y., SATO, S., E TABATA, S. Generation of 7137 non-redundant expressed sequence tags from a legume, *Lotus japonicus*. **DNA Research**, v.7, p.127-130, 2000.
- BOYES WK, DOURSON ML, PATTERSON J, TILSON HA, SETTE WF, MACPHAIL RC, LI AA, O'DONOGHUE JL. EPA's neurotoxicity risk assessment guidelines. **Fundamental and Applied Toxicology**, v. 40, p.175-84, 1997.
- COLLINS N.C, WEBB C.A, SEAH S, ELLIS JG, HULBERT S.H.; PRYOR A..The isolation and mapping of disease resistance gene analogs in maize. **MPMI**, v.11, p. 968-978, 1998.
- DIXON M.S., HATZIXANTHIS K., JONES D.A., HARRISON K.; JONES J.D. The tomato Cf-5 disease resistance gene and six homologs show pronounced allelic variation in leucine-rich repeat copy number. **Plant Cell**, v.10, p. 1915-1925, 1998.
- ELLINGBOE, A. 2000. Plant-pathogen interactions: genetic and comparative analyses. **European Journal of Plant Pathology**, v. 107, p. 79-84, 2000.
- GAUTHERET, D.; POIROT, O., LOPEZ, F.; AUDIC, S. E CLARVERIE, J.M. Alternate polyadenylation in human mRNAs: a large-scale analysis by EST clustering. **Genome Research**, v.8, p.524-530, 1998.
- HAMMOND-KOSACK K.E., TANG S., HARRISON K.; JONES J.D. The tomato Cf-9 disease resistance gene functions in tobacco and potato to confer responsiveness to the fungal avirulence gene product avr 9. **Plant Cell**, v.10, p.1251-1266, 1998.
- KANAZIN, V.; MAREK, L.F.; SHOEMAKER, R.C. Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean- **Proceeding of the National Academy of Sciences** v. 93, p.11746-11750, 1996.
- NELSON, S.C.; STARR, J.L. E SIMPSON, C.E. Expression of resistance to *Meloidogyne arenaria* in *Arachis batizocoi* and *A. cardenasii*. **Journal of Nematology** v. 22, p.242-244, 1990.
- ROMMENS, C. M. T; SALMERON, J.M; OLDROYD, G.E.D; STASKAWICZ, B.J. Intergeneric transfer and functional expression of the tomato disease resistance gene *Pto*. **Plant Cell**, v.7, p.1537-1544, 1995.
- SATO, S., KANERKO, T., NAKAMURA, Y., ASAMIZU, E. KATO, T. E TABATA, S. Structural analysis of a *Lotus japonicus* genome. I. Sequence features and mapping of fifty-six TAC clones which cover the 5,4 Mb regions of the genome. **DNA Research**, v. 8, p. 311-318, 2001.
- SHEN, K.A.; MEYERS, B.C.; ISLAM-FARADI, M.N.; CHIN, D.B.; STELLY, D.M.; MICHELMORE, R.W. Resistance gene candidates identified by PCR with degenerate

oligonucleotide primers map to clusters of resistance genes in lettuce. **Molecular Plant – Microbe Interactions**, v. 11, p. 815-823, 1998.

THILMONEY, R.L.; CHEN, Z.; BRESSON, R.A.; MARTIN, G.B. Expression of the tomato *Pto* gene in tobacco enhances resistance to *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* expressing *avrPto*. **Plant Cell**, v.7, p 1529-1536, 1995.

WANG, X.; WENG, O.; YOU, A.; ZHU, L.; H.E., G. .Cloning and characterization of rice RH3 gene induced by brown planthopper. **Chinese Science**, v.48, n.18, p.1976-1981, 2003.

WAUGH R, MCLEAN K, FLAVELL AJ, PEARCE SR, KUMAR A, THOMAS BB, POWELL W. Genetic distribution of Bare-1-like retrotransposable elements in the barley genome revealed by sequence-specific amplification polymorphisms (S-SAP). **Molecular and General Genetics**, v.253, p.687-694, 1997.

YOSHIMURA S, YAMANOUCHI U, KATAYOSE Y, TOKI S, WANG ZX, KONO I, KURATAN, YANO M, IWATA N, SASAKI T. Expression of Xa1, a bacterial blight-resistance gene in rice, is induced by bacterial inoculation. **Proceeding of the National Academy of Sciences USA**, v. 95, p.1663-1668, 1998.

YU YG, BUSS GR AND MAROOF MA Isolation of a superfamily of candidate disease-resistance genes in soybean based on a conserved nucleotide-binding site. **Proceeding of the National Academy of Sciences USA**, v.93, p. 11751-11756, 1996.

16 - CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE PROMOTORES DO GENE DA PROTEÍNA DE CONJUGAÇÃO A UBIQUITINA DA FAMÍLIA LEUBC4 DE SOJA E ALGODÃO.

Guimarães, L.M.^{1,2}; Viana, A.A.B.¹; Batista, J.A.N.¹ e Grossi de Sá, M.F.¹.

¹Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – Brasília – DF; ²UniCEUB – Faculdade de Ciências da Saúde – Brasília – DF

RESUMO

A cotonicultura representa uma grande parcela da produção agrícola brasileira, sendo responsável por cerca de US\$ 23 bilhões do faturamento da indústria no ano de 2003. Entretanto, o controle de insetos praga gera custos de cerca de 25% dos custos totais de produção. Dentre os insetos-praga, o bicudo do algodoeiro desponta como o causador de maiores danos e, devido ao seu hábito alimentar dentro dos botões florais do algodoeiro, seu controle pelo uso de inseticidas torna-se ineficiente. A produção de plantas geneticamente modificadas expressando proteínas que confirmam à planta resistência a insetos praga vem sendo utilizada com bastante sucesso. Porém, para a obtenção destas plantas, é necessário o controle e direcionamento da expressão das proteínas extomotóxicas para os locais onde o inseto praga gera dano. Com o objetivo de obter seqüências capazes de direcionar a expressão de proteínas no botão floral do algodoeiro, foram isolados por Tail-PCR as regiões promotoras do gene da proteína de conjugação à ubiquitina da família *Leubc4* de algodão e soja. Essas seqüências foram subclonadas adjacentes ao gene *gus*, e a capacidade de promover a expressão deste gene em folhas e em botões florais de plantas de *Arabidopsis thaliana* foi demonstrada.

INTRODUÇÃO

A cultura do algodão vem assumindo um importante papel na economia agrícola brasileira. Despontando como 5º produtor mundial de algodão e 3º maior exportador. Só esse ano, a produção de algodão em pluma aponta um aumento de 48,1%, e as exportações devem quase triplicar em relação à safra de 2003. Realizado em junho, o último levantamento da Conab (Companhia Nacional de Abastecimento), órgão do Ministério da Agricultura, aponta que a produção chegará em 2004 a 1,25 milhão de toneladas de algodão em pluma, ou seja, 407 mil toneladas a mais do que na safra anterior. Só na Bahia, o avanço da lavoura foi de 121%. Primeiro no ranking de produção, Mato Grosso deve colher 574 mil toneladas, ou seja, 45,7% da safra nacional. A Bahia produzirá 252,3 mil toneladas, 20,1% da lavoura brasileira. Em seguida, vem Goiás (13,2%).

Dentre as pragas que atacam o algodoeiro, destacam-se o bicudo do algodoeiro-*Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae), o Curuquerê - *Alabama argilacea* (Lepidoptera: Noctuidae), a lagarta da maçã - *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae), a lagarta rosada - *Pectinophora gossypiella* (Saund, 1844) (Lepidoptera - Gelechiidae) e a lagarta do cartucho do milho – *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). O bicudo do algodoeiro apresenta-se como o inseto causador de maiores prejuízos, devido a extensão de seus danos, a dificuldade de seu controle e sua grande capacidade de adaptação.

O bicudo do algodoeiro possui sua fase larval endofítica, impossibilitando seu controle por biopesticidas, e quando adulto, alimenta-se dos botões florais, onde realiza sua ovoposição. Além disso, no período entre safras, este busca abrigo em soqueiras e matas adjacentes até o novo plantio (Oliveira-Neto, 2002).

As estratégias usadas atualmente para o controle desta praga têm se baseado na busca de cultivares resistentes via melhoramento genético clássico, no controle químico e no monitoramento por meio de armadilhas. O uso de inseticidas onera significativamente o custo de produção, além dos danos causados à saúde do agricultor e ao meio ambiente. A produção de plantas geneticamente modificadas expressando proteínas entomotóxicas em espécies vegetais economicamente importantes vem sendo utilizada com sucesso e sendo, cada vez mais, vista como uma forma bastante promissora (Gatehouse e Gatehouse, 1998,

Carlini e Grossi de Sá, 2002, James, 2002). Diferentes classes de proteínas são conhecidas por conferirem resistência contra insetos predadores, nematóides, vírus, bactérias e fungos. As mais conhecidas são as lectinas, proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs), glicohidrolases, defensinas, inibidores de enzimas hidrolíticas digestivas e as toxinas Cry (Gatehouse e Gatehouse, 1998, Carlini e Grossi de Sá, 2002). O potencial biotecnológico de muita dessas proteínas de defesa foi demonstrado através de sua introdução em plantas de interesse. Plantas transgênicas portando genes que codificam toxinas provenientes do *Bacillus thuringiensis* (Bt), atualmente ocupam 11,4 milhões de hectares e estão revolucionando a agricultura (Shelton *et al*, 2002).

Para a obtenção de plantas transgênicas com níveis adequados de proteínas que confirmem resistência a planta, a escolha de promotores que direcionem a expressão para o local de dano é extremamente importante. Além disso, existem poucos promotores efetivos para expressão em plantas disponíveis no mercado atualmente, e é necessário o pagamento de *royalties* para o uso destes, onerando, assim, a produção.

Com o objetivo de buscar seqüências promotoras para a expressão no botão floral do algodoeiro, foram amplificados por “Tail-PCR”, em nosso laboratório (Batista e Grossi de Sá, 2000; Batista *et al.*, 2001), os promotores de algodão e soja dos genes da proteína de conjugação a ubiquitina da família *Leubc4* (Bird, 1996). O “Tail-PCR” (thermal asymmetric interlaced PCR) consiste numa aplicação da técnica de PCR que permite o isolamento de segmentos de DNA adjacentes a seqüências conhecidas (Liu e Whittier, 1995). Este gene foi selecionado em função de ter sido previamente caracterizado como sendo expresso no sítio de alimentação de nematóides fitoparasitas sedentários (Bird, 1996) e em botões florais de algodão.

Portanto, este trabalho tem por objetivo caracterizar funcionalmente os promotores isolados de algodão e soja. A estratégia adotada consistiu na transformação de *Arabidopsis* com construções gênicas contendo os promotores, associados ao gene repórter *gus*, e na análise da expressão do gene repórter nas plantas transformadas. A partir destas análises será possível avaliar o potencial destes promotores para direcionar a expressão de transgenes em plantas de algodão visando o desenvolvimento de plantas resistentes ao bico do algodoeiro.

MATERIAL E MÉTODOS

Os promotores do gene da proteína de conjugação a ubiquitina da família *Leubc4* de soja e algodão foram isolados conforme descrito por Batista e Grossi de Sá (2000) e Batista *et al.* (2001), respectivamente. Os fragmentos promotores foram subclonados em vetores da série pCAMBIA associados ao gene repórter *gus*. A fim de analisar o efeito da região 5' não traduzida na expressão do gene repórter as construções foram feitas tanto com todo o segmento amplificado, incluindo a região 5' não traduzida e a extremidade 5' da região codificadora do gene (uceS8.3 para soja e uceA1.7 para algodão), como somente com a região do promotor (uceSpro1 para soja e uceApro2 para algodão). A subclonagem da região promotora foi feita por PCR, através de primers localizados um pouco a jusante do motivo TATA box. Como controle negativo, as construções foram também feitas na orientação anti-senso, uceS8.8 para soja e uceApro1 e uceA6.1 para algodão (Figura 1). Como controle positivo foi usado o promotor CaMV35S, na construção pBI426. Uma representação esquemática das construções é mostrada na figura 1.

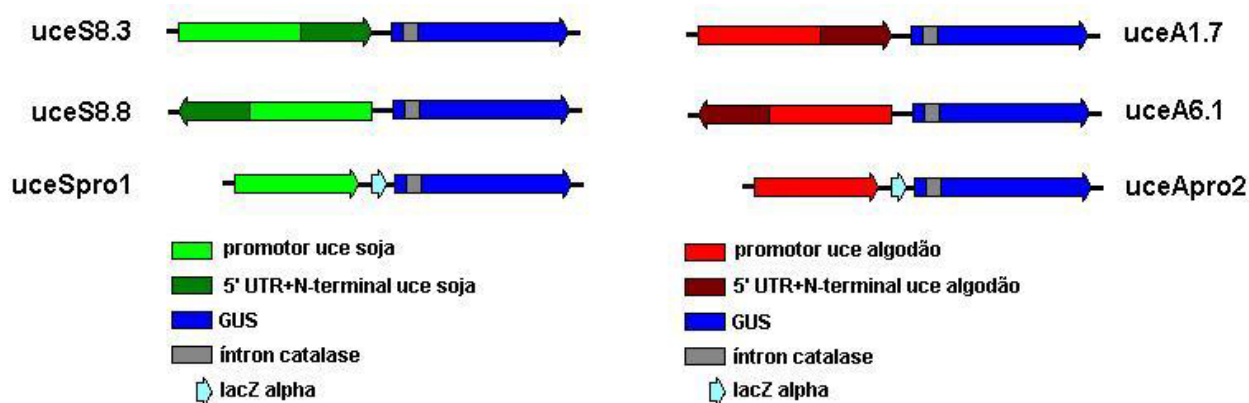


Figura 1. Representação esquemática das construções com os promotores de soja e algodão do gene da proteína de conjugação a ubiquitina da família *Leubc4*. Os elementos da figura não estão em escala. uceS8.3 – gene *gus* sob controle do promotor do gene da proteína de conjugação à ubiquitina de soja fusionado à sua região 5' não traduzida. uceS8.8 – mesma construção, porém com a região promotora e 5'UTR invertidas. uceSpro1 - gene *gus* sob controle apenas do promotor do gene da proteína de conjugação à ubiquitina de soja. O mesmo foi feito para as construções contendo o promotor do gene da proteína de conjugação à ubiquitina do algodão uceA1.7, uceA6.1 e uceApro2, respectivamente.

Estes vetores foram introduzidos em células de *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404, as quais foram utilizados para a transformação de plantas de *Arabidopsis thaliana* Columbia pela técnica de infiltração de botões florais (Clough e Bent, 1998).

Esta técnica consiste no encharcamento de botões florais de *A. thaliana* com uma cultura de agrobactéria contendo 50 g/L (w/v) sacarose e 300 μ L/L Silwet L-77. Para tal, os primeiros botões florais foram cortados de forma a quebrar a dominância apical, favorecendo a multibrotação lateral e a sincronização do desenvolvimento dos botões. Após o surgimento de diversos botões, as plantas de *A. thaliana* foram submersos de ponta-cabeça na cultura de agrobactéria transformada com cada construção, de forma a atingir apenas os botões florais. Essa imersão durou cinco minutos. Em seguida, os copos contendo as plantas foram posicionados de lado sobre a bancada e cobertos por um saco plástico. Este procedimento visa a manutenção da umidade e a prevenção da contaminação do solo e da base das plantas, caso a cultura da bactéria escorra. Após 24 horas, os copos foram re-posicionados de pé, onde foram incubados por 3 a 4 semanas, até a coleta de sementes. Todo este procedimento foi realizado em casa de vegetação.

As sementes coletadas foram desinfestadas em álcool 70%, por 1 minuto e em hipoclorito de sódio 1% por 15 minutos e lavadas 4 vezes com água estéril. Em seguida, foram semeadas em meio de cultura MS contendo higromicina na concentração de 20 μ g/ml, visando a seleção de transformantes (Figura 2a).

As plântulas germinadas e enraizadas foram transferidas para copos com terra estéril e cobertas de forma a preservar a umidade, e transferidas para casa de vegetação (Figura 2b).

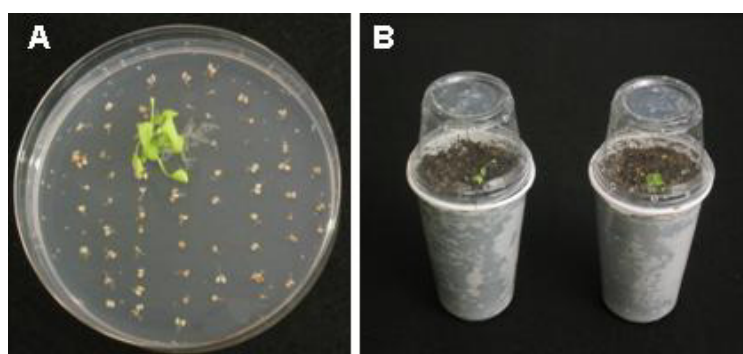


Figura 2. (A) Seleção de transformantes em higromicina 20 μ g/ml e (B) aclimação das plântulas selecionadas em casa de vegetação.

Após algumas semanas, dependendo do desenvolvimento das plantas aclimatadas, cortes de raízes, caules, folhas e botões florais foram realizados e incubados em solução de X-gluc, com o objetivo de verificar a expressão do gene *gus*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A eficiência obtida na transformação das plantas de *Arabidopsis* foi de 0,1%. Esta eficiência de transformação é baixa, comparada a dados da literatura que descrevem uma eficiência de transformação na faixa de 0,8 a 1,0%.

A construção senso do promotor de soja uceS8.3 (ver construções na Fig.1), bem como as de algodão, uceA1.7 e uceApro2 promoveram atividade enzimática de β -glucoronidase, enquanto as construções anti-senso, uceS8.8 e uceA6.1 foram inativas, conforme o esperado (Figura 3 e 4), quando comparado ao controle positivo contendo o promotor CaMV35S (Cauliflower Mosaic Virus 35S promoter) duplicado com o *enhancer* do AMV (Alfafa Mosaic Virus) (CaMV35SdAMV) (Figura 3A).

Como uma primeira análise, a estratégia utilizada neste trabalho para a caracterização funcional dos promotores, previamente isolados do algodão e soja, foi eficiente para se avaliar o potencial destes promotores. Os resultados obtidos mostram que os promotores nas construções uceS8.3, uceA1.7 e uceApro2 são capazes de direcionar a expressão de β -glucoronidase e representam seqüências reguladoras com potencial uso na produção de plantas geneticamente modificadas, como o algodoeiro expressando proteínas inseticidas. Análises estão em processo para se avaliar a expressão dirigida por estas seqüências em outros tecidos, quantificar os níveis de expressão e buscar os módulos responsáveis pela expressão em cada tecido vegetal.

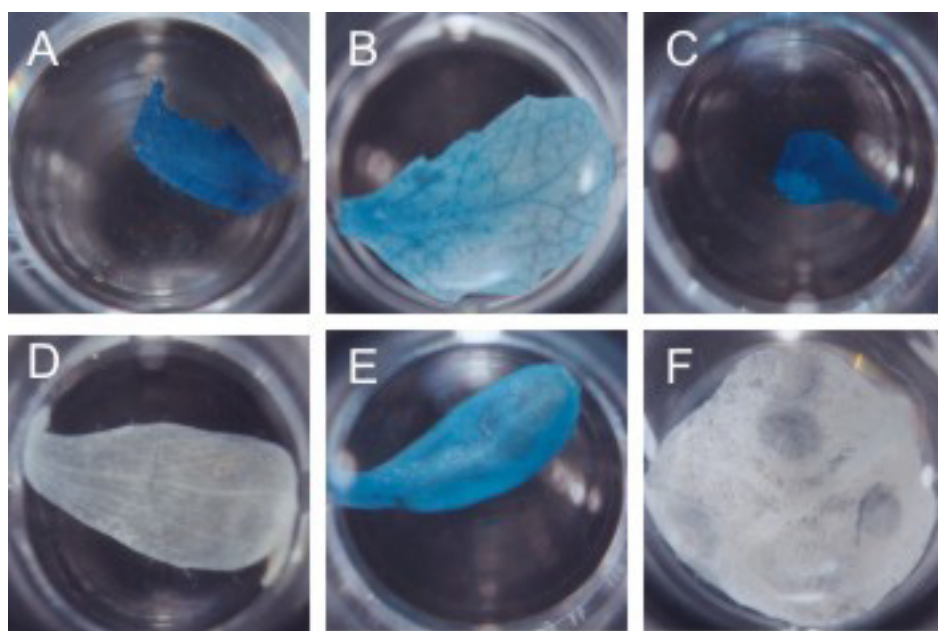


Figura 3. Amostras de folhas de *A. thaliana* transformadas com o gene *gus* sob controle das seqüências das construções (A) 35SdAMV; (B) uceApro2; (C) uceA1.7; (D) uceA6.1; (E) uceS8.3; (F) uceS8.8.

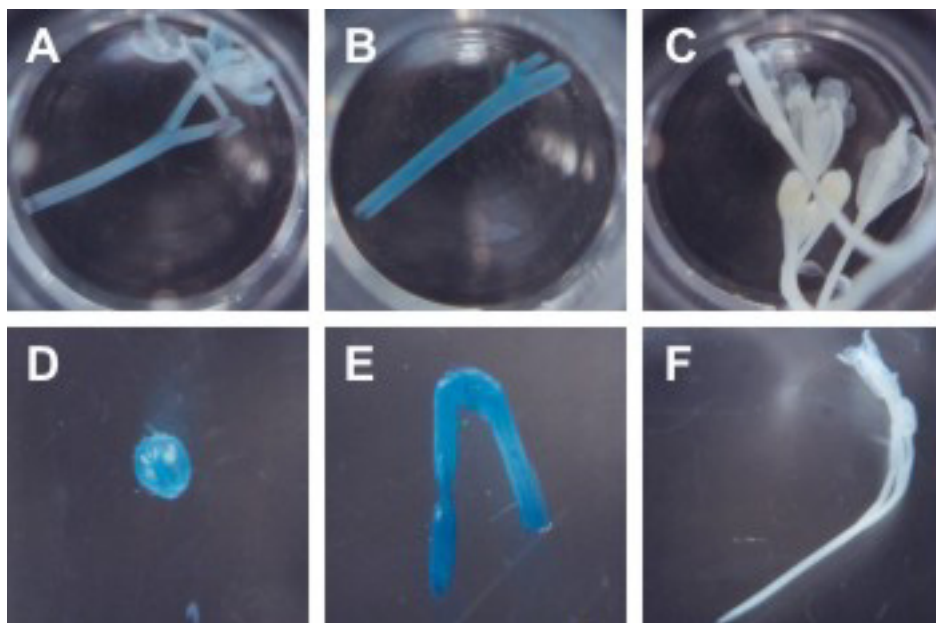


Figura 4. Amostras de botões florais de *A. thaliana* transformadas com o gene GUS sob controle das seqüências das construções (A) uceApro2; (C) uceA6.1; (D) uceS8.3; (F) uceS8.8 e de caule sob controle das seqüências das construções (B) uceApro2 e (E) uceS8.3.

PERSPECTIVAS

Os dados preliminares aqui mostrados serão novamente analisados quanto à localização da expressão do gene GUS por ensaios em X-gluc de cortes histológicos e a quantificação dos níveis de expressão por ensaios fluorimétricos será realizada. Além disso, estudos modulares destes promotores serão realizados de modo a tentar isolar e caracterizar módulos que dirijam a expressão em tecidos específicos, visando a identificação e o isolamento de regiões responsáveis pela expressão no botão floral do algodoeiro. Ao final destes experimentos, a patente destas seqüências será também descrita.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BATISTA, J. A. N.; GROSSI DE SÁ, M. F. Isolamento e caracterização de um promotor de soja potencialmente ativo no sítio de alimentação de nematóides sedentários. In: **Anais do XXII Congresso Brasileiro de Nematologia**, Uberlândia. p.97, 2000.
- BATISTA, J. A. N., OLIVEIRA-NETO, O. B., FRAGOSO, R. R.; GROSSI DE SÁ, M. F. Isolamento e caracterização de um promotor de algodão ativo no botão floral In: **Anais do III Congresso Brasileiro de Algodão**, Campo Grande. v.1. p.27 – 28, 2001.
- BIRD, D.MCK. Manipulation of host gene expression by root-knot nematodes. **Journal of Parasitology**. v.82, p.881-888, 1996.
- CLOUGH S.J.; BENT A.F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*, **Plant Journal**, v. 16, n.6, p. 735-743, 1998.
- GATEHOUSE, A.M.R.; GATEHOUSE, J.A. Identifying proteins with insecticidal activity: use of encoding genes to produce insect-resistant transgenic crops. **Pesticide Science**, v.52, p.165-175, 1998.
- JAMES, C. Global status of commercialized transgenic crops. **ISAA**., 2002.
- LIU, Y.; WHITTIER, R.F. Thermal asymmetric interlaced PCR: Automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking. **Genomics**, v. 25, p. 674-681, 1995.
- OLIVEIRA-NETO, O.B. Mecanismos moleculares de controle do bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis*, Boheman, 1843). Tese de doutorado. Universidade de Brasília, DF, 2002.

SHELTON, A.M., ZHAO, J-L & ROUSH, R.T. Economic, Ecological, Food, Safety and Social consequences of the development of Bt transgenic plants. **Annual Review of Entomology**, v.47, p. 845-881, 2002.

17 - ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE cDNAs DE PROTEINASES SERÍNICA E ASPÁRTICA DO NEMATÓIDE FORMADOR DE GALHAS *Meloidogyne incognita*.

Fragoso, R.R.^{1,2}; Batista, J.A.N.¹; Oliveira Neto, O.B.^{1,2}; Dusi, D.A.¹ e Grossi-de-Sá, M.F.¹

¹ Embrapa - Recursos Genéticos e Biotecnologia; ² Departamento de Biologia Celular, UnB.

RESUMO

Esse trabalho descreve o isolamento e caracterização de cDNAs codificadores de uma proteinase serínica (*Mi-ser1*) e uma aspártica (*Mi-asp1*). Utilizando oligonucleotídeos iniciadores degenerados, foram isolados cDNAs a partir de RNA total através das estratégias de RT-PCR, 5' e 3' RACE (rapid amplification of cDNA ends). A análise das seqüências peptídicas preditas das proteinases determinou sítios putativos de clivagem em pré-região, pró-região e madura. *Mi-ser1* apresenta identidade de 25% com proteinases serínicas, enquanto *Mi-asp1* apresenta identidade de 66% com proteinases aspárticas. Análises por Southern blot mostram que *Mi-ser1* e *Mi-asp1* são simples-cópia e análises por Northern blot e RT-PCR indicam que o nível de expressão de *Mi-ser1* é maior em fêmeas, enquanto que o de *Mi-asp1* é maior em ovos.

INTRODUÇÃO

Nematóides parasitas de plantas são fitopatógenos importantes para importantes culturas da agricultura mundial. Os nematóides endoparasitas sedentários, agrupados nos três gêneros *Globodera*, *Heterodera* e *Meloidogyne*, causam grandes perdas econômicas (Atkinson *et al.*, 2003), dentre estes o *M. incognita* é a espécie mais importante, visto que possui ampla distribuição geográfica e diferentes opções de hospedeiros (Trudgill e Blok, 2001). As práticas agrícolas atuais são usualmente ineficientes e ambientalmente perigosas, além de aumentar os custos de produção. A transformação de plantas surge como alternativa promissora para obtenção de plantas resistentes (Atkinson *et al.*, 2001). Diferentes plantas resistentes têm sido geradas através da inserção de genes de toxinas de *Bt*, lectinas, ureases, inibidores de enzimas hidrolíticas com α -amilases e proteinases (Carlini e Grossi-de-Sa, 2002). Seguindo a estratégia de inibição digestória (Urwin *et al.*, 1998; Lilley *et al.*, 1999), este trabalho teve com objetivo identificar moléculas como potencial alvo na defesa de plantas contra nematóides. Inicialmente, a caracterização da atividade proteolítica de *M. incognita* foi realizada por ensaios fluorimétricos. A amplificação de fragmentos de cDNAs codificadores de proteinases serínicas e aspárticas foi obtida utilizando as técnicas de RT-PCR, 5' e 3' RACE. As análises por Southern blot indicam que os genes são simples-cópia. A expressão em nível transcricional de *Mi-ser1* é grande em fêmeas e de *Mi-asp1* em ovos.

MATERIAL E MÉTODOS

Cultura e Coleta de Nematóides

M. incognita foi produzido em *Lycopersicon esculentum* L. (tomateiro), mantidos em casa de vegetação, a partir da infecção com ovos cujas fêmeas foram identificados por espécie e raça através de eletroforese de isoenzimas (colaboração da Dra. Regina Carneiro). Após 2-4 meses de infecção, os nematóides em diferentes estádios de vida foram extraídos das raízes conforme protocolos estabelecidos.

Ensaio Proteolítico

Extratos protéicos brutos de fêmeas de *M. incognita* foram preparados em tampão ácido ou básico. A degradação proteolítica de substratos fluorogênicos específicos para as proteinases aspártica e serínica foi monitorada por fluorímetro na presença e ausência de inibidores de proteinases específicos para essas classes de proteinases.

Isolamento de cDNAs

O RNA total de *M. incognita* J2 foi extraído através do kit RNeasy (Qiagen) e utilizado como molde para a síntese de cDNA, reação realizada pela transcriptase reversa AMV, por 1 h a 42°C, iniciada com o primer dT-AP. Amplificações de RT-PCR foram realizadas utilizando-se oligonucleotídeos degenerados, desenhados a partir de regiões conservadas de cada classe de proteinase. Para isolar fragmento à montante do produto do RT-PCR, usamos a estratégia do 5'RACE. Assim, novo cDNA foi sintetizado com oligonucleotídeos específicos (sera ou asp4a), purificado e acrescido de sequência homopolimérica de adenosinas em sua extremidade 3' com a enzima terminal transferase (TdT). Na primeira PCR foi usado um segundo oligonucleotídeo (serb ou asp4b) e o dT-AP. Na segunda, um terceiro oligonucleotídeo (serc ou asp4c) e o AP. Para amplificar o cDNA completo usamos a estratégia do 3'RACE, onde amplificamos por PCR com um oligonucleotídeo específico sense (Miasp4d ou Mi3serf) e o dT-AP. Numa segunda rodada (Nested PCR), foi usado um segundo oligonucleotídeo específico (Miasp4e ou Mi3serg) e o AP.

Seqüenciamento e Análise das seqüências

Fragmentos amplificados eram clonados em pGEM-T (Promega) para produção de massa através da extração de DNA plasmidial e seqüenciamento. As seqüências obtidas foram alinhadas contra o banco de dados pelo BlastX (Altschul *et al.*, 1990). Alinhamentos múltiplos de seqüências foram feitos pelo ClustalW (Thompson *et al.*, 1994). A análise do peptídeo sinal foi realizada pelo SignalP (Nielsen *et al.*, 1997).

Hibridizações de Ácidos Nucléicos

DNA genômico digerido (*Eco* RI, *Hind* III, *Xba* I, *Pst* I ou *Nsi* I) e RNA total (ovos, J2 e fêmeas) foram separados em gel de agarose, transferidos para membrana de nylon e sondados com *Mi-asp1* e *Mi-ser1* marcados.

RT-PCR semi-quantitativo

RNA total de ovos, J2 e fêmeas foram utilizados para síntese de cDNA. Com oligonucleotídeos para *Mi-asp1*, *Mi-ser1* e *Actina*, as PCR foram acompanhadas até o 35º ciclo de amplificação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Isolamento do cDNA Mi-ser1

Uma seqüência de cDNA de 1372 pb foi isolada a partir de RNA total de fêmeas, utilizando-se as técnicas de RT-PCR, 5' e 3' RACE. O cDNA denominado *Mi-ser1* apresenta 26% de identidade com as proteinases serínicas (Fig 1). Análise por Southern blot mostrou três bandas com intensidades crescentes, sugerindo que existe por genoma haplóide uma cópia de *Mi-ser1*, além de dois homólogos. A proteinase predita *Mi-ser1* apresenta peptídeo sinal (22 aa), pró-região (33 aa) e proteinase madura (341 aa) com massa molecular predita de 37.680 Da. A proteinase *Mi-ser1* possui características típicas de proteinases serínicas tipo quimotripsina. Por Northern blot e RT-PCR, demonstramos a presença de 6,9 vezes mais mRNAs de *Mi-ser1* em fêmeas do que em ovos (Fig 2). Entretanto, em J2 a quantidade de mRNAs se mostrou muito reduzida, 26 vezes menos que em fêmeas.

AAT TTAGGATG GTGTGAAA TTGCTGCG GTTGATTA AATTGAGT ATTGAAATTA AATTGTTG TCATTATTA TTAATCTT TTTTGTG CAGTCTTC TGCGTATG ATGTGAAA AAG 120
 ATA TCAAGAT GATGAGATG AATTTTTC AGCTGTTC TAAAGATG TGTGTGCTT CCAATTT TTTCCGAA TCAGCTTT TCTTTAG GCGTACG TGCGACCC AACAAACA TCA 240
I K D D E A I F S S C L K Q C V A P K L F P K E T V S F R A Y D D T F T H I N 45
 ACC TGACACT TTTTGTTC CTCTGTTC GCGAGCTT TCAAGATG TCAATGAAATA GAAATAT AGCGTGTG ATAAATAT AAAATTT GCTGTATC TGCTGCGCA CTGATTC ANT 240
 L T F F V A L L V D T V S K C Q I N T K C T A V I I S K N F L L S A A S C I Q Y 105
 ATG CGATTAA CGAGTATC AATGCTTT ATCGTTC AGAGAGAG CGAATGATG AATTTTTC CGAGAGAG ATTACATA TTTACCG AATTTCAA TTTAGACA CGAGATG CTS 480
 A I K P D N N C F I D P K E K E L V D F R P N K E I T I F T D I S N L D N A S T D 145
 GAC ATGCTTC CGATGAG AATATGCG CGCTCTC TGCTATTA TAAACAAAATA ATATGCA ATATGACA CGCTGATT TGCGACT TGCACTAT TGAATTGA TACGAGC TCA 400
 N A S Q V K K I S R L S N Y Y K T K N N S N N T R S F S D L A L I K L Y N K L N 185
 ACA TGATTTA ATACTAGA CGATATG ATTCGCA TAACTTTAA TGAAGCTT GCGAGCTT GTCTATTT TGCGTTTC GGAAGAG CGAATTT GTCAATGA CGAGCGC CTS 720
 I S L N T R P I C I P N N F N K T F D F N V Y F S D F D K E R S L L N D R P P A 225
 CTS TGCGAT AACTGAT TTAAGCGC CAATGCA CACCTTCA ACTATCTTT CATCTGCA GACTTTGT CATAGATT GAGACCC ATGAGTGA AATATGTA TATTGTS CGS 960
 V D D K L N F S D Q L N T V Q L S F S S P K L C H T L D T F S N K N Y D I C A D 245
 GCA GAAAGAT GCTGATC TCAAGAT GACTTGT TGCGCCCT GCTGATGAT AGAGAGC AGAGCTTT TTAATGAG ATTCTTC TACTGCG TGACAGC CGAGAAA ATT 960
 R K D A D I S K D D S D S F L V H Y E N S R A F L V D I S S T A S A P A D R N L 305
 TAA CGAGACA GCACTTAT AAGAGGAA TACCTGA TCTTTTGT TGCTGTCTCA GACACTGT CATGCTTA AAGAGCTG AGTAATG TGAATGAT CGCTTTG TTAAGAT TAC 1080
 T Q Q A L N K D E Y F D S F V R V S R N C Q N L K D V S K V K C I F F D L Q L P 345
 CAG AGAATAT AGAGAGAA GCTCTTGA ATTTTGA ATCAAGCAA AATATGATG GATATGAA ATTGACTT GAGAGAG CTAGCAA TGAAGAAA AGAATGAA AGAGAG ATA 1200
 K E C K E R A L R I L K S N K N K N H D N K I D V D A S L T N K E T Q V K E K D K 385
 AAA GTATTTTC CAGCTTC TTAATCTA TCGCTG ATTGAGT TGTGCTGAG ATTGAG GTTGAAG GTTGAAG TGGTGTG GATTAT GAGAGTAA TAAAGTAA AAGAGAA TTG 1220
 S I F Q N F L N L F D * 395
 ATA TATTATG TAAATGTT GATGCTTG ATTGAGT AAAGGGGGG AATGTGAAAA AAAAAAA AAA 1272

Figura 1. Sequência nucleotídica e peptídica de *Mi-ser1*. Os nucleotídeos do 5' e 3' UTR estão em minúsculo e os da ORF em maiúsculo. O sítio de poliadenilação está sublinhado. Os resíduos das regiões pré e pró estão dentro de caixas. Os resíduos da tríade catalítica estão circulados.

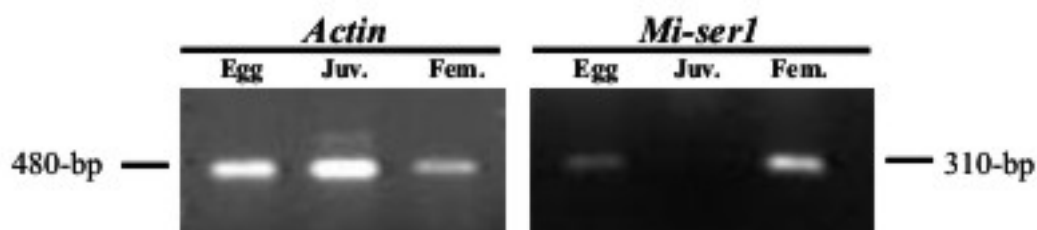


Figura 2. RT-PCR de *Mi-ser1* e *Actina*. Amplificação com oligonucleotídeos específicos para comparação do acúmulo de mRNAs em diferentes estádios de desenvolvimento.

Isolamento do cDNA *Mi-asp1*

A partir de RNA total de juvenis J2, foi amplificado por RT-PCR, 5' e 3' RACE o *Mi-asp1* de 1464 pb, que apresenta 66% de identidade com proteinases aspárticas de nematóides (Fig 3). Por Southern blot, detectamos uma banda de maior intensidade e três de menor, sugerindo que *Mi-asp1* é simples-cópia de uma família de proteinases aspárticas. A proteinase *Mi-asp1* apresenta uma pró-região (71 aa) e proteinase madura (378 aa) com massa molecular predita de 41.502 Da. Através de RT-PCR semiquantitativo, foi observada uma taxa de transcrição 6 vezes maior em ovos do que fêmeas ou J2 (Fig 4). Para determinar a expressão espacial e temporal de *Mi-asp1* está em andamento estudos de hibridização in situ nos estádios de ovo, J2 e fêmea.

NIELSEN, H., ENGELBRECHT, J., BRUNAK, S.; VON HEIJNE, G. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. **Protein Engineering**, 10 1-6, 1997.

THOMPSON, J.D., HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J.: CLUSTAL W. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, 22 4673-80, 1994.

TRUDGILL, D.L.; BLOK, V.C. Apomictic, polyphagous root-knot nematodes: exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, 39 53-77, 2001.

URWIN, P.E., MCPHERSON, M.J.; ATKINSON, H.J. Enhanced transgenic plant resistance to nematodes by dual proteinase inhibitor constructs. **Planta**, 204 472-9, 1998.

18 - GENÔMICA FUNCIONAL APLICADA NO CONTROLE DE PARASITISMO DO NEMATÓIDE FORMADOR DE GALHAS *Meloidogyne incognita*.

Viana, A.A.B.¹; Fragoso, R.R.^{1,2}; Guimarães, L.M.^{1,3}; Paes, N.S.¹;

Batista, J.A.N.¹; Brígido, M.M.² e Grossi-de-Sá, M.F.¹

¹ Embrapa - Recursos Genéticos e Biotecnologia; ² Departamento de Biologia Celular - Universidade de Brasília; ³ UniCEUB

RESUMO

Visando o isolamento de cDNAs envolvidos no estabelecimento e manutenção de parasitismo do nematóide formador de galhas *Meloidogyne incognita*, uma biblioteca de ESTs de juvenis J2 foi produzida que resultou em 1523 seqüências, sendo 166 contigs e 1357 singlets. A análise computacional das seqüências obtidas foi feita para predição funcional, agrupamento filogenético, predição de transferência horizontal gênica e importância na interação planta-patógeno. Após a determinação de alvos potenciais, bioensaios baseados em RNAi serão realizados para avaliar a função dos genes e o potencial uso no melhoramento de plantas de interesse agrônomo.

INTRODUÇÃO

O nematóide formador de galhas *Meloidogyne incognita* causa grandes perdas em diversas culturas agrícolas de importância mundial (Atkinson *et al.*, 2001; Trudgill e Blok, 2001). Seu ciclo de vida consiste de seis estádios fenológicos (ovo, quatro juvenis e adulto). A fase infectiva juvenil 2 (J2) penetra na raiz da planta hospedeira, via força mecânica e degradação enzimática, para estabelecer as interações planta-patógeno (Eycken *et al.*, 1996; Van der Eycken *et al.*, 1996; Gheysen e Fenoll, 2002). Quando em condições favoráveis de parasitismo, o J2 se diferencia em fêmeas adultas apomíticas, que completam seu ciclo de vida depositando em torno de 2.000 ovos. As práticas agrícolas atuais não são efetivas no controle desse nematóide (Urwin *et al.*, 1998; Lilley *et al.*, 1999; Atkinson *et al.*, 2003). A transformação genética de plantas visando à obtenção de cultivares resistentes tem gerado grandes expectativas como uma ferramenta específica, efetiva e poderosa no controle de nematóides. Vários grupos vêm produzindo bibliotecas de ESTs de nematóides (Parkinson *et al.*, 2003) para descoberta de moléculas-alvo para interrupção do parasitismo (McCarter *et al.*, 2003). Objetivando identificar genes envolvidos na infecção e estabelecimento do parasitismo, uma biblioteca de cDNAs foi construída de mRNAs de J2, utilizando o vetor pSORT para clonagem de cDNAs. Desta biblioteca de cDNAs foram obtidas cerca de 2880 seqüências validadas, organizadas em 166 clusters e 1357 singlets. A anotação gênica foi feita pela comparação com banco de dados (GenBank), através do BlastX, e pela organização funcional, através da determinação da ontologia gênica (GO). Além disso, foi feita uma varredura para identificação de seqüências candidatas de transferência horizontal gênica. A construção de uma biblioteca subtrativa de cDNAs de J2 e fêmeas por combinação das técnicas de RDA (Representational Difference Analysis) e SSH (Suppression Subtractive Hybridization) objetivando aumentar a representatividade está em andamento. Em paralelo, cada seqüência de EST está sendo amplificada por PCR para produção de massa que serão aplicadas sobre uma membrana (macroarranjo) para análise com sondas de RNAs de fêmeas visando à determinação de ESTs diferenciais de cada estágio de desenvolvimento do *M. incognita*. Esses estudos poderão contribuir para a determinação de genes envolvidos no estabelecimento e manutenção de parasitismo.

MATERIAL E MÉTODOS

Cultura e Coleta de Nematóides

M. incognita foi produzido em *Lycopersicon esculentum* L. (tomateiro), mantidos em casa de vegetação, a partir da infecção com ovos cujas fêmeas foram identificados por espécie e raça através de eletroforese de isoenzimas (colaboração da Dra. Regina Carneiro).

Após 2-4 meses de infecção, os ovos de nematóides foram extraídos das raízes para eclosão *in vitro* conforme protocolo estabelecido.

Extração de mRNA

RNA total foi extraído de *M. incognita* J2 através do kit RNeasy da Qiagen, para a purificação de mRNA em coluna de poliA.

Reação de Transcrição Reversa

A síntese de cDNA a partir de mRNA foi feita pela transcriptase reversa do kit Superscript Plasmid System (Invitrogen). Após ligação de adaptadores, foi sintetizado a fita sense para resultar em dsDNA.

Clonagem, Seqüenciamento e Análise das Seqüências

Os cDNAs foram clonados em pSORT (Invitrogen) para produção de massa através da extração de DNA plasmidial e seqüenciamento. As seqüências obtidas foram alinhadas contra o banco de dados pelo BlastX (Altschul *et al.*, 1990).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir da construção e seqüenciamento da biblioteca de cDNAs de J2, foram obtidas 2880 seqüências de ESTs que quando filtradas eletronicamente resultaram em 166 contigs (Fig 1 e 2) e 1357 singlets (Fig 3). As seqüências filtradas e eliminadas correspondem a rRNAs, arraste de nucleotídeos e baixa qualidade de seqüenciamento (valor de PHRED). As 1523 ESTs positivas foram analisadas individualmente conforme seu resultado do BlastX e separadas conforme sua identidade de seqüência com o banco de dados (Fig 4). As ESTs foram então divididas em grupos filogenéticos: gênero *Meloidogyne*; gêneros *Heterodera* ou *Globodera*; filo Nematoda; Outros (qualquer espécie exceto nematóides); Pioneiro (desconhecido). Para estudar a hipótese de transferência horizontal de genes, as ESTs do grupo “Outros” com alta identidade foram selecionadas para comprovação de origem helmíntica através de hibridização *in situ*, análise de códon usage, presença e localização de íntrons e alinhamento múltiplo de seqüências peptídicas preditas. Assim, identificamos ESTs interessantes para testes posteriores com alta identidade aos reinos Monera (31 ESTs), Protozoa (16 ESTs), Fungi (6 ESTs) e Plantae (13 ESTs).

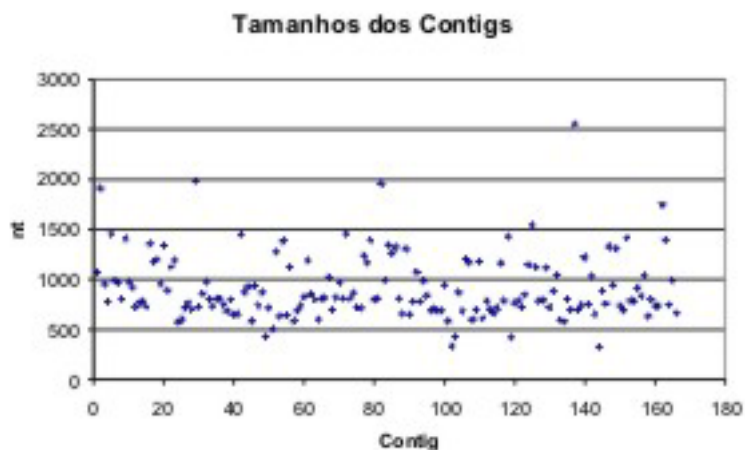


Figura 1. Tamanho dos 166 contigs formados por sobreposição de ESTs contíguas.

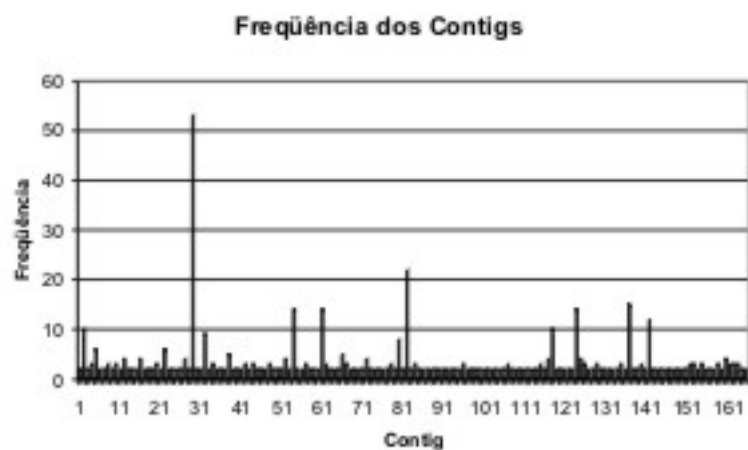


Figura 2. Número de ESTs que se sobrepuseram para formação dos 166 contigs.

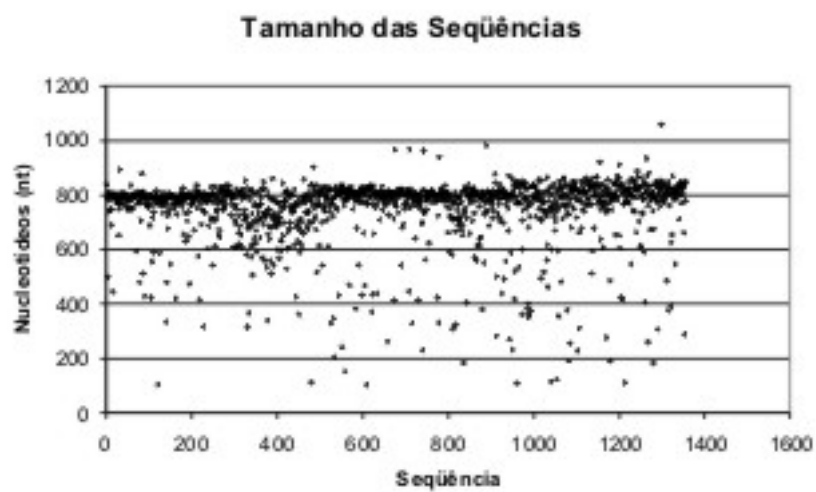


Figura 3. Tamanho em nucleotídeos das 1357 ESTs singlets.

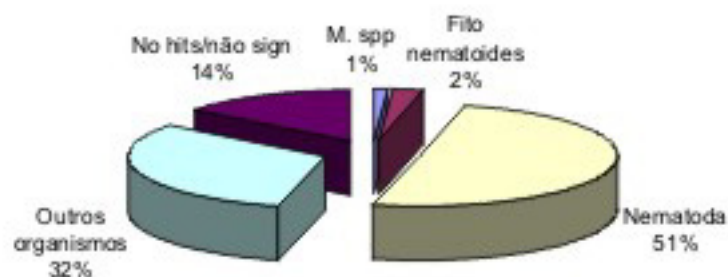


Figura 4. Distribuição das 1523 ESTs anotadas conforme resultado do BlastX.

PERSPECTIVAS

Diferentes estratégias vêm sendo utilizadas para se identificar produtos gênicos importantes no estabelecimento e manutenção do sítio de alimentação através dos estudos de genômica funcional. Após a escolha dos genes candidatos alvos de intervenção, a técnica do RNA interferente será utilizada para testar o papel de genes individuais, através de sua perda de função. Numa segunda etapa, transformaremos plantas de interesse agrônômico serão transformadas visando à obtenção de cultivares resistentes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTSCHUL, S.F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal Molecular Biology**, 215 403-10, 1990.
- ATKINSON, H.J., GREEN, J., COWGILL, S.; LEVESLEY, A.: The case for genetically modified crops with a poverty focus. **Trends in Biotechnology**, 19 91-6, 2001.
- ATKINSON, H.J., URWIN, P.E.; MCPHERSON, M.J. Engineering plants for nematode resistance. **Annual Review of Phytopathology**, 41 615-39, 2003.
- EYCKEN, V.D.W., ENGLER, J.A., INZÉ, D., MONTAGU, M.V.; GHEYSEN, G. A molecular study of root-knot nematode-induced feeding sites. **The Plant Journal** 9 45-54, 1996.
- GHEYSEN, G.; FENOLL, C.: Gene expression in nematode feeding sites. **Annual Review of Phytopathology**, 40 191-219, 2002.
- LILLEY, C.J., DEVLIN, P., URWIN, P.E.; ATKINSON, H.J. Parasitic nematodes, proteinases and transgenic plants. **Parasitology Today** 15 414-7, 1999.
- MCCARTER, J.P., MITREVA, M.D., MARTIN, J., DANTE, M., WYLIE, T., RAO, U., PAPE, D., BOWERS, Y., THEISING, B., MURPHY, C.V., KLOEK, A.P., CHIAPELLI, B.J., CLIFTON, S.W., BIRD, D.M.; WATERSTON, R.H. Analysis and functional classification of transcripts from the nematode *Meloidogyne incognita*. **Genome Biology**, 4 R26, 2003.
- PARKINSON, J., MITREVA, M., HALL, N., BLAXTER, M.; MCCARTER, J.P. 400000 nematode ESTs on the Net. **Trends in Parasitology** 19 283-6, 2003.
- TRUDGILL, D.L.; BLOK, V.C. Apomictic, polyphagous root-knot nematodes: exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens. **Annual Review of Phytopathology** 39 53-77, 2001.
- URWIN, P.E., MCPHERSON, M.J.; ATKINSON, H.J. Enhanced transgenic plant resistance to nematodes by dual proteinase inhibitor constructs. **Planta**, 204 472-9, 1998.
- VAN DER EYCKEN, W., DE ALMEIDA ENGLER, J., INZE, D., VAN MONTAGU, M.; GHEYSEN, G. A molecular study of root-knot nematode-induced feeding sites. **Plant Journal**, 9 45-54, 1996.

19 - UTILIZAÇÃO DE PROPEPTÍDEOS COMO FATORES DE INIBIÇÃO DE PROTEINASES DE FITONEMATÓIDES

Silva, F.B.^{1,2}; Batista, J.A.N.¹; Del Sarto, R.P.^{1,4}; Marra, B.M.^{1,3} e Grossi-de-Sá, M.F.^{1,2}

¹Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ²Universidade Católica de Brasília,

³Departamento de Biologia Celular, UnB. ⁴Faculdade da Terra de Brasília, Brasília, DF.

RESUMO

Diversos estudos têm relatado a presença de proteinases cisteínicas, serínicas, aspárticas e metaloproteinases em nematóides e embora os nematóides parasitas de plantas tenham diferentes estratégias de alimentação, estes possuem uma necessidade comum de proteínas em sua dieta. Plantas transformadas geneticamente com inibidores de proteinases digestivas reduzem o crescimento e desenvolvimento de nematóides, demonstrando a importância das proteinases para a sobrevivência do parasita. É sabido que as proteinases são sintetizadas como pré-pró-proteinases e são convertidas em sua forma ativa através da clivagem e liberação do propeptídeo, indicando que estes atuam como inibidores das proteinases cognatas, até o endereçamento correto da proteína recém-sintetizada. Baseando-se nesta informação, diversos estudos têm relatado a inibição de proteinases por seus propeptídeos, demonstrando que estes exibem certa seletividade dentro da mesma classe ou mesmo dentro da mesma família de enzimas. O propeptídeo de uma proteinase cisteínica (PROHGCP) do nematóide formador do cisto em soja (*Heterodera glycines*) inibe a proteinase cognata, bem como as proteinases presentes em extratos de *H. glycines* e em extratos do nematóide formador da galha, *Meloidogyne incognita*. A análise filogenética das proteinases cisteínicas destes nematóides mostra 68% de identidade entre as seqüências, o que corrobora com os resultados obtidos *in vitro*. Baseando-se nestes resultados, especula-se que os propeptídeos também possam atuar como inibidores das proteinases de outros nematóides, como *Meloidogyne javanica*, contribuindo de maneira significativa para o controle destas pragas e para a prospecção de novas estratégias para o controle da atividade proteolítica dos nematóides.

INTRODUÇÃO

Os nematóides fitoparasitas da família Heteroderidae são os que causam os maiores danos econômicos à agricultura e incluem os formadores do cisto (gênero *Heterodera* e *Globodera*) e formadores da galha (gênero *Meloidogyne*). Os nematóides destes três gêneros fazem interações complexas com suas plantas hospedeiras, induzindo a formação de células especializadas, essenciais ao seu desenvolvimento e reprodução, a partir das quais eles obterão os nutrientes durante a fase sedentária de sua vida (Hussey *et al.*, 2002). Embora não matem seu hospedeiro, os nematóides fitosedentários afetam severamente seu crescimento e desenvolvimento. A busca de estratégias que controlem a invasão e manutenção destes parasitas nas raízes das plantas tem sido uma das principais preocupações já que, atualmente, há uma grande demanda por parte da sociedade pelo desenvolvimento de uma agricultura que empregue menos agrotóxico, diminuindo as contaminações aos agricultores e ao meio ambiente. Assim, o uso de variedades modificadas geneticamente, que expressam genes com atividade nematicida, tem sido utilizado como uma estratégia alternativa para o controle destas pragas.

Dentre as moléculas com atividade nematicida, os inibidores de proteinases, quando expressos em plantas transgênicas, têm demonstrado alta eficiência no controle do crescimento, desenvolvimento e fecundidade de diferentes nematóides fitoparasitas, como *Globodera pallida*, *Heterodera schachtii*, *Rotylenchulus reniformis* e *Meloidogyne incognita*. (Urwin *et al.*, 1997; Vain *et al.*, 1998; Urwin *et al.*, 2000), dentre outros. Isto confirma a importância das enzimas proteolíticas para a sobrevivência desses organismos, fazendo com que sejam alvos potenciais para o controle dessas pragas.

A maioria das quatro classes de proteinases é sintetizada como pré-pró-proteína, e a conversão na forma madura ativa da enzima só ocorre após a clivagem do propeptídeo. Desta forma, uma das funções dos propeptídeos é atuar como inibidor *in vivo* de sua proteinase cognata, impedindo que a proteinase atue precocemente, antes do endereçamento correto da proteína. Baseando-se nesta informação, diversos estudos têm mostrado que os propeptídeos das diferentes proteinases, incluindo metalo-proteinases (Tang *et al.*, 2002), proteinases aspárticas (Fusek *et al.*, 1991), serínicas (Taylor e Lee, 1997; Basak e Lazure, 2003) e cisteínicas (Lalmanach *et al.*, 1998; Visal *et al.*, 1998; Roche *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 2004), atuam como inibidores das proteinases cognatas, em alguns casos como inibidores específicos e em outros, como inibidores gerais para diferentes enzimas dentro da mesma família de proteinases. Considerando-se estas observações, estudos moleculares envolvendo a especificidade dos propeptídeos como inibidores de proteinases de nematóides poderão auxiliar o desenvolvimento de novas estratégias de controle destas pragas, visando a obtenção de plantas geneticamente modificadas expressando estes fatores.

MATERIAL E MÉTODOS

Clonagem, expressão e purificação de uma proteinase cisteínica do nematóide formador do cisto em soja, Heterodera glycines, e de seu propeptídeo

A partir de uma variante da proteinase cisteínica previamente clonada por Urwin e colaboradores (1997), o gene que codifica esta proteinase (HGCP-Iv) e seu propeptídeo (PROHGCP) foram clonados nos vetores de expressão em *E. coli* pET102D TOPO (Invitrogen[®]) e as proteinases foram expressas segundo Silva e colaboradores (2004). As proteínas recombinantes foram purificadas em cromatografia por afinidade, em coluna Ni-NTA (Qiagen[®]), sob condições desnaturantes, segundo recomendações do fabricante. HGCP-Iv foi renaturada por diluição lenta em uma solução tampão contendo 0.1 M Na₂PO₄, 3 mM DTT, 2 mM EDTA, pH 6.0. O propeptídeo recombinante foi excisado do gel de poliacrilamida e a partir deste foi produzido antisoro em camundongos fêmeas (Balb/c), segundo Grossi-de-Sá e colaboradores (1988).

Determinação da atividade inibitória do propeptídeo

Foi preparado um extrato do nematóide formador da galha, *Meloidogyne incognita*, em tampão 0.1M TrisHCl pH 8.0, para determinação da atividade proteolítica. A atividade inibitória do propeptídeo (PROHGCP) foi analisada contra a proteinase recombinante (HGCP-Iv), bem como sobre a atividade proteolítica do extrato de *M. incognita* (10ng de proteína total por ensaio, para ambos). A atividade cisteínica foi medida utilizando-se 10 mM do substrato Z-Phe-Arg-AMC em 100 mL de solução tampão contendo 2.5 mM DTT, 5% DMSO, 0.1 M Na₂HPO₄, 2.0 mM EDTA, pH 6.5. A atividade proteolítica foi medida em unidades de fluorescência, após 15 min de reação. A atividade inibitória foi obtida pela pré-incubação do propeptídeo com a proteinase recombinante e com o extrato de *M. incognita*, individualmente. Procedimento similar foi adotado com o inibidor sintético de proteinases cisteínicas E-64. O antisoro foi utilizado com controle para suprimir a atividade inibitória do propeptídeo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A fim de analisar a especificidade do propeptídeo sobre a proteinase cisteínica de *H. glycines*, a proteinase e seu propeptídeo foram expressos no sistema heterólogo *E. coli*. A figura 1 mostra a expressão e purificação dessas proteínas (HGCP-Iv e PROHGCP). Embora o nível de expressão tenha sido alto, em ambos os casos as proteínas foram expressas na forma insolúvel sendo, portanto, purificadas sob condições desnaturantes. A atividade inibitória do propeptídeo foi analisada contra a atividade proteolítica da proteinase cisteínica

renaturada *in vitro* e contra o extrato protéico de fêmeas de *M. incognita*. As proteinases foram inibidas pelo propeptídeo e pelo inibidor sintético de proteinases cisteínicas, E-64 (Figura 2). A adição do antisoro direcionado contra o propeptídeo à mistura de reação aboliu a inibição pelo propeptídeo, demonstrando que esta se processa devido à presença do propeptídeo. A análise das seqüências de aminoácidos das proteinases cisteínicas de *H. glycines* e *M. incognita* mostram alta identidade (68%) entre as seqüências (Figura 3), o que corrobora com os dados obtidos, indicando que a alta identidade pode estar envolvida na inibição de ambas proteinases. Os resultados inibitórios apóiam outros relatos sobre a efetividade dos propeptídeos, na inibição da proteinase correlata (Chagas *et al.*, 1996; Lalmanach *et al.*, 1998; Visal *et al.*, 1998; Roche *et al.*, 1999; Yamamoto *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2004), o que amplia o espectro de inibidores disponíveis para o desenvolvimento de plantas modificadas geneticamente, que sejam efetivas no controle da invasão e manutenção do parasita no tecido do hospedeiro.

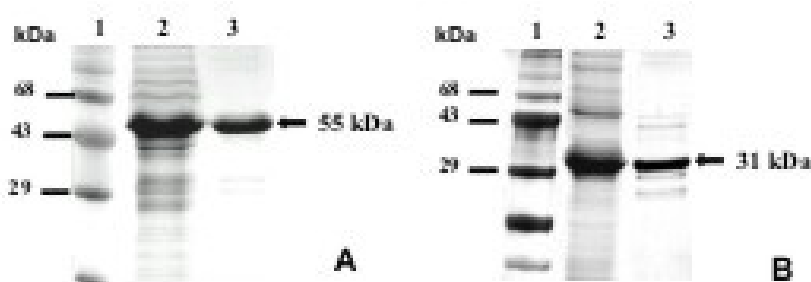


Figura 1: Expressão e purificação da proteinase cisteínica e do propeptídeo. (A) HGCP-Iv e (B) PROHGCP. Coluna 1, marcador de peso molecular. Coluna 2, extrato protéico total e coluna 3, proteínas purificadas. As proteínas recombinantes estão indicadas com as setas.

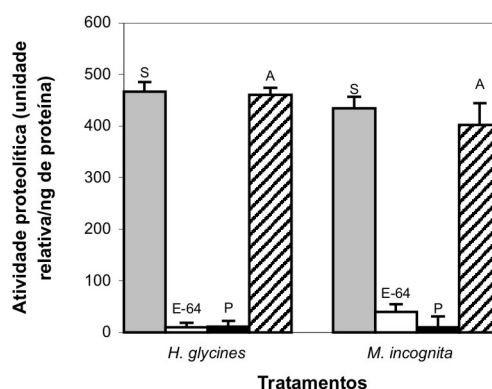


Figura 2. Atividade inibitória do propeptídeo (PROHGCP) contra a proteinase cisteínica de *H. glycines* (HGCP-Iv) e contra o extrato de *M. incognita*. Os reagentes principais estão representados por S (substrato fluorimétrico Z-Phe-Arg-AMC), E-64 (inibidor sintético de proteinase cisteínica), P (propeptídeo) e A (antisoro). Os resultados foram obtidos por repetições e em triplicatas.

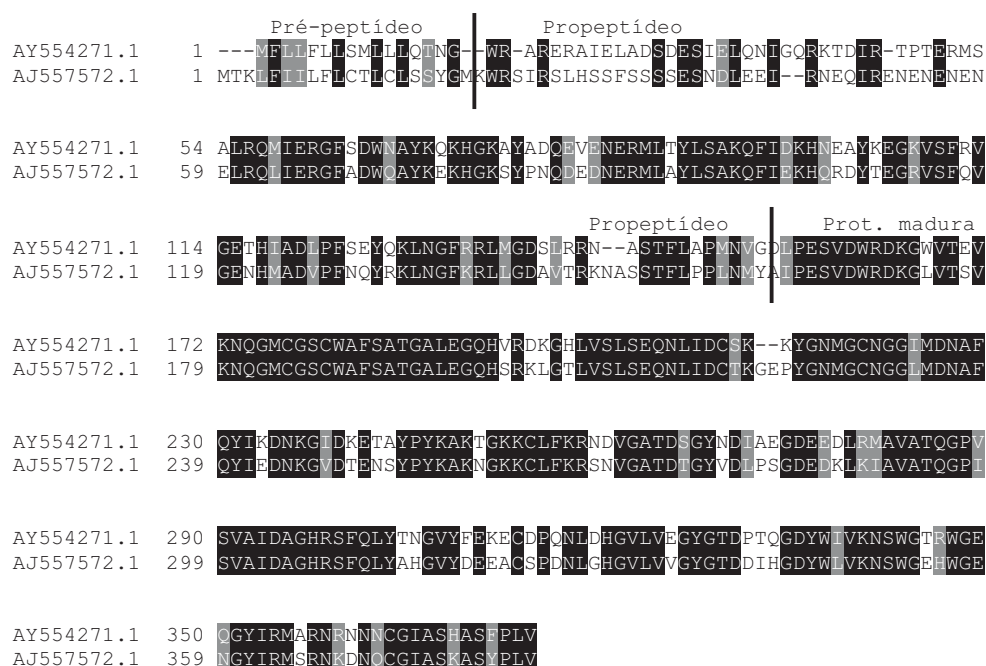


Figura 3. Alinhamento das seqüências proteolíticas das proteinases cisteínicas de *H. glycines* (AY554271.1) e *M. incognita* (AJ557572.1). As seqüências foram alinhadas através do programa computacional ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>).

PERSPECTIVAS

Diversos estudos têm mostrado que os propeptídeos atuam, *in vitro*, como inibidores das proteinases cognatas. No entanto, a maioria dos estudos foi direcionada para as interações entre os propeptídeos e as catepsinas humanas (Quraishi *et al.*, 1999; Billington *et al.*, 2000; Guay *et al.*, 2000; Chowdhury *et al.*, 2002), entre outras. Atualmente só existe um relato sobre a utilização do propeptídeo como controle da atividade proteolítica de nematóide parasita animal (Roche *et al.*, 1999). Além dos resultados obtidos *in vitro*, Marra e colaboradores (*in press*, 2005) demonstraram que raízes de soja transformadas com o gene que expressa para o propeptídeo em questão (*prohgcp*) reduzem em até 50% o desenvolvimento de ovos e em até 30% o desenvolvimento de fêmeas de *H. glycines*, indicando que o propeptídeo influencia no crescimento e desenvolvimento dos nematóides. A análise estrutural das interações dos propeptídeos com suas proteínas correlatas e o conhecimento da especificidade destes propeptídeos, também representa uma nova estratégia, seja pelo uso destes propeptídeos em plantas modificadas geneticamente, ou pelo desenho racional de inibidores mais seletivos. Desta forma, a expressão de outros propeptídeos e a análise cruzada entre diferentes pragas, pode auxiliar na determinação da especificidade destas moléculas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BASAK, A. AND LAZURE, C. Synthetic peptides derived from the prosegments of proprotein convertase 1/3 and furin are potent inhibitors of both enzymes. **Biochemical Journal**, 373: 231–239, 2003.
- BILLINGTON, C.J.; MASON, P.; MAGNY M.-C.; MORT, J.S. The slow-binding inhibition of cathepsin K by its propeptide. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 276, 924–929, 2000.
- CHAGAS, J.R.; DE MARTINO, M.F.; GAUTHIER, F.; LALMANACH, G. Inhibition of cathepsin B by its propeptide: use of overlapping peptides to identify a critical segment. **FEBS Letters**, 392: 233–236, 1996.

CHOWDHURY, S.F.; SIVARAMAN, J.; WANG, J.; DEVANATHAN, G.; LACHANCE, P.; QI, H.; MENARD, R.; LEFEBVRE, J.; KONISHI, Y.; CYGLER, M.; SULEA, T.; PURISIMA, E.O. Design of noncovalent inhibitors of human cathepsin L. From the 96-residue proregion to optimized tripeptides. **Journal of Medicinal Chemistry**, 45: 5321–9, 2002.

FUSEK, M.; MARES, M.; VAGNER, J.; VOBURKA Z.; BAUDY, M. Inhibition of aspartic proteinases by proapart peptides of human procathepsin D and chicken pepsinogen. **FEBS Letters**, 287 (1-2): 160-162, 1991.

GROSSI-DE-SÁ, M.F.; MARTINS DE SÁ, C.; HARPER, F.; COUX, O.; AKHAYAT, O.; PAL, J.K.; FLORENTIN, Y.; SCHERRER, K. Cytolocalization of prosomes as a function of differentiation. **Journal of Cell Science**, 89(2): 151-165, 1988.

GUAY, J.; FALGUEYRET, J.P.; DUCRET, A.; PERCIVAL, M.D.; MANCINI, J.A. Potency and selectivity of inhibition of cathepsin K, L and S by their respective propeptides. **European Journal of Biochemistry**, 267, 6311-6318, 2000.

HUSSEY, R.S.; DAVIS, E.L.; BAUM, T.J. Secrets in secretions: genes that control nematode parasitism of plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, 14(3): 183-194, 2002.

LALMANACH, G.; LECAILLE, F.; CHAGAS, J.R.; AUTHIÉ, E.; SCHARFSTEIN, J.; JULIANO, M.A.; GAUTHIER, F. Inhibition of trypanosomal cysteine proteinases by their propeptides. **Journal of Biological Chemistry**, 273 (39): 25112-25116, 1998.

QURAISHI, O.; NAGLER, D.K.; FOX, T.; SIVARAMAN, J.; CYGLER, M.; MORT, J.S.; STORER, A.C. The occluding loop in cathepsin B defines the pH dependence of inhibition by its propeptide. **Biochemistry**, 38: 5017–23, 1999.

ROCHE, L.; TORT, J.; DALTON, J.P. The propeptide of *Fasciola hepatica* cathepsin L is a potent and selective inhibitor of the mature enzyme. **Molecular & Biochemical Parasitology**, 98: 271-277, 1999.

SILVA, F.B.; BATISTA, J.A.N.; MARRA, B.M.; FRAGOSO, R.R.; MONTEIRO, A.C.S.; FIGUEIRA, E.L.Z.; GROSSI-DE-SÁ, M.F. Pro domain peptide of HGCP-Iv cysteine proteinase inhibits nematode cysteine proteinases **Genetics and Molecular Research**, 3(3): 342-355, 2004.

TANG, B.; NIRASAWA, S.; KITAOKA, M.; HAYASHI, K. The role of the N-terminal propeptide of the pro-aminopeptidase processing protease: refolding, processing, and enzyme inhibition. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 296: 78-84, 2002.

TAYLOR, M.A.J.; LEE, M.J. Trypsin isolated from the midgut of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, is inhibited by synthetic pro-peptides in vitro. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 235: 606–609, 1997.

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

URWIN, P.E.; LEVESLEY, A.; MCPHERSON, M.J.; ATKINSON, H.J. Transgenic resistance to the nematode *Rotylenchulus reniformis* conferred by *A. thaliana* plants expressing protease inhibitors. **Molecular Breeding**, 6: 257-264, 2000.

VAIN, P.; WORLAND, B.; CLARKE, M.C.; RICHARD, G.; BEAVIS, M.; LIU, H.; LEECH, M.; SNAPE, J.; CHRISTOU, P.; ATKINSON, H. Expression of an engineered cysteine proteinase inhibitor (Oryzacystatin-IDD86) for nematode resistance in transgenic rice plants. **Theoretical and Applied Genetics**, 96: 266-271, 1998.

VISAL, S.; TAYLOR, M.A.J.; MICHAUD, D. The proregion of papaya proteinase IV inhibits Colorado potato beetle digestive cysteine proteinases. **FEBS Letters**, 434: 401-405, 1998.

YAMAMOTO, Y.; KURATA, M.; WATABE, S.; MURAKAMI, R.; TAKAHASHI, S.Y. Novel cysteine proteinase inhibitors homologous to the proregions of cysteine proteinases. **Current Protein and Peptide Science**, 3(2): 231-238, 2002.

20 - ANÁLISE FUNCIONAL DE GENES COM POTENCIAL ENVOLVIMENTO NO PARASITISMO DO FITONEMATÓIDE *Meloidogyne incognita* (Kofoid e White, 1919) RAÇA III.

Souza, D.S.L.^{1,2}., Romano, E¹., Grossi, M.^{1,2}., Marra, B, M.^{1,2}., Martins de Sá, C²., Fragoso, R.R.^{1,2}., Grossi de Sá, M.F.^{1,2}.

¹EMBRAPA - Recursos Genéticos e Biotecnologia; ²UnB – Departamento de Biologia Celular.

RESUMO

Os fitonematóides do gênero *Meloidogyne* estão entre os mais prejudiciais para a economia agrícola mundial. Estes parasitas radiculares de hábito sedentário infectam mais de 2000 espécies de plantas e se reproduzem rapidamente, sendo, portanto, de difícil controle. O uso de nematicidas, a rotação de culturas e a utilização de variedades resistentes possuem limitações que incluem a contaminação dos solos, a persistência dos nematóides no ambiente circunvizinho e a resistência limitada a algumas espécies ou raças de *Meloidogyne*, respectivamente. Portanto, novas estratégias biotecnológicas estão sendo desenvolvidas com o objetivo de controlar estes patógenos, a partir do conhecimento de seu ciclo de vida e da descoberta de novos genes a serem introduzidos em plantas para efeito nematicida ou nematostático, impedindo assim, o processo de infecção ou parasitismo pelo fitonematóide. Dentre estas estratégias, a genômica funcional tem se destacado, pois permite avaliar a função de genes com potencial envolvimento no parasitismo dos fitonematóides. No presente trabalho, foram subclonados dois destes genes, que codificam para uma putativa proteína quinase e um putativo fator de transcrição, de aproximadamente 500pb expressos nas glândulas esofágicas de *M. incognita*. Plantas de *Arabidopsis thaliana* serão produzidas expressando os referidos genes em fusão com a proteína GFP. A análise histológica posterior permitirá avaliar o efeito destes genes no fenótipo dos transformantes e a localização subcelular das proteínas expressas por análise, em microscópio confocal, da fluorescência emitida pela GFP. A função destes genes também será averiguada pela tecnologia de RNA interferente. Os transformantes expressando a dupla fita de RNA, poderão portanto, conferir resistência a planta contra o nematóide caso haja silenciamento de um gene com importância para o parasitismo, disponibilizando portanto, uma nova ferramenta para o controle da Meloidoginose.

INTRODUÇÃO

O parasitismo de plantas por nematóides possui longa história evolutiva, ainda difícil de ser interpretada devido ao limitado conhecimento sobre a origem e a distribuição das especializações morfológicas, bioquímicas, genéticas e comportamentais, que transformaram organismos de vida livre, em parasitas altamente adaptados a diversos tecidos e espécies vegetais (Baldwin *et al.*, 2004). Os fitonematóides são responsáveis por prejuízos que ultrapassam 100 bilhões de dólares anuais (Opperman e Bird, 1998), e a maioria dos danos é atribuída aos endoparasitas sedentários obrigatórios, representados pelos nematóides dos cistos (*Heterodera* spp. e *Globodera* spp.) e pelos formadores de galhas nas raízes (*Meloidogyne* spp.). Estes são capazes de induzir a formação de sítios de alimentação nas raízes das plantas hospedeiras, onde se estabelecem como forma sedentária, e chegam a atingir um alto nível de fecundidade (Lilley *et al.*, 1999) (Figura - 1).

Os produtos das glândulas de secreção de nematóides parasitas de animais e vegetais têm sido frequentemente associados ao processo infectivo e ao estabelecimento e manutenção do parasitismo. As moléculas bioativas das secreções de parasitas animais têm sido relacionadas a defesa em ambientes oxidantes, digestão de proteínas e modulação ou supressão do sistema imune dos hospedeiros (Yatsuda *et al.*, 2003; Goodridge *et al.*, 2005).

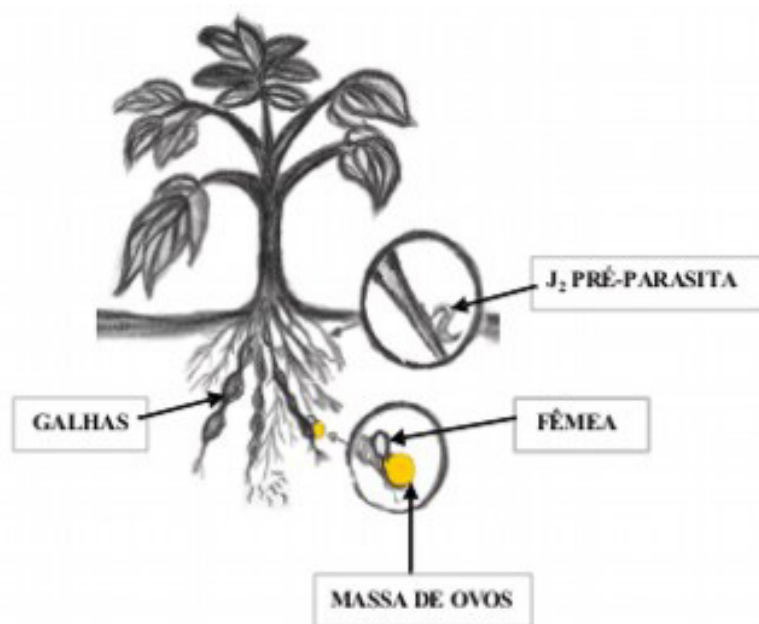


Figura 01 – Desenho esquemático de planta infectada com o nematóide formador de galhas *M. incognita*.

No processo infectivo dos fitonematóides, as proteínas de secreção têm sido relacionadas com a penetração e a migração nas raízes, onde vários produtos das glândulas ventrais, as quais estão mais ativas nesta fase, são enzimas envolvidas na degradação da parede celular e já foram descritas em várias espécies dos gêneros *Heterodera*, *Globodera* e *Meloidogyne*, onde podemos destacar: as α -1,4-endoglucanases e proteínas de ligação a celulose (Wang *et al.*, 1999; Smant *et al.*, 1998; Goellner *et al.*, 2001; Goellner *et al.*, 2000; Rosso *et al.*, 1999; Yan *et al.*, 2001), α -1,4-xilanase (Dautova *et al.*, 2001), poligalacturonases (Jaubert, 2002) e pectato liases (Gao *et al.*, 2003; De bôer *et al.*, 2002; Popeijus *et al.*, 2000). Por outro lado, algumas proteínas sintetizadas nas glândulas subventrais poderiam estar envolvidas em outras etapas do parasitismo, como a indução de sítios de alimentação. Dentre elas, podemos citar a calreticulina (CRT) de *M. incognita* (Jaubert *et al.*, 2002) e a corismato mutase (CM) de *Meloidogyne javanica* (Lambert *et al.*, 1999).

A atividade da glândula dorsal se torna maior nos estágios parasitários mais avançados (Davis *et al.*, 2000), o que sugere que os produtos dessa glândula estariam mais relacionados à indução e manutenção dos sítios de alimentação. Recentes trabalhos revelam que a maioria dos genes expressos na glândula dorsal de *M. incognita* e *Heterodera glycines*, não possuem grande identidade com outros genes, já caracterizados e depositados no banco de dados, tornando-se necessário a realização de novos estudos que revelem a função desses genes (Huang *et al.*, 2003; Gao *et al.*, 2003). Por outro lado, a análise do parasitoma de *H. glycines* revelou seqüências para corismato mutase e proteínas de ubiquitinação similares a SKP1 na glândula dorsal, indicando o papel dos produtos desta glândula para o controle dos processos celulares da planta hospedeira (Gao *et al.*, 2003). No referido trabalho, a presença da corismato mutase, exclusivamente na glândula dorsal de *H. glycines*, contrasta com o seu aparecimento exclusivo nas glândulas subventrais de *M. javânica* e *Globodera pallida* (Jones *et al.*, 2003; Lambert *et al.*, 1999). Estas divergências confirmam a necessidade de estudos mais detalhados que determinem o real papel de cada glândula e de seus produtos para o estabelecimento e manutenção das relações parasitárias com o hospedeiro.

Desta forma, a genômica funcional se destaca como a ferramenta mais importante para a elucidação destas questões. A expressão heteróloga destes genes e a tecnologia do

RNA interferente já demonstraram a importância da corismato mutase de *M. javanica* no controle da diferenciação celular em raízes de soja (Doyle e Lambert, 2003) e o silenciamento eficiente de genes de proteinases digestivas de *H. glycines* e *G. pallida* provocou alteração na proporção sexual de nematóides adultos (Urwin *et al.*, 2002). Nosso objetivo portanto, é utilizar estas duas metodologias para analisar a função de dois potenciais genes de parasitismo, recentemente subclonados e que codificam para uma putativa proteína quinase e um putativo fator de transcrição de *M. incognita*. Os resultados obtidos neste trabalho poderão fornecer importantes informações sobre o modelo de interação planta-nematóide, bem como, disponibilizar uma construção com RNA interferente a ser introduzida em plantas de interesse econômico visando o controle de fitonematóides.

MATERIAL E MÉTODOS

Extração de nematóides das raízes de tomateiro e obtenção de cDNA total de fêmeas.

Plantas de tomateiro com cerca de 40 dias após inoculo foram processadas segundo a metodologia prescrita por Hussey e Barker (1973). As fêmeas foram coletadas em uma peneira de 100 µm e em seguida separadas em um tubo eppendorf para posterior extração de RNA e síntese do cDNA.

Desenho de primers e amplificação dos genes da quinase e do fator de transcrição putativos.

A partir de uma biblioteca de cDNA de glândulas de *M. incognita* já descrita (Huang *et al.*, 2003), foram selecionadas algumas seqüências, após submeter a biblioteca a uma análise de similaridade (BLAST). Os oligos para a amplificação dos genes de interesse foram desenhados eliminando o peptídeo sinal putativo utilizando o programa signalP (Nielsen *et al.*, 1997). A amplificação dos genes foi realizada pela técnica de PCR aplicando um gradiente de temperatura de 35 a 55 °C, para determinar a melhor temperatura de amplificação de cada gene.

Silenciamento de genes potencialmente envolvidos com a fitopatogenicidade de nematóides por RNAi in vitro.

A produção de RNAs fita dupla (dsRNAs) será realizada por síntese de cada uma das cadeias dos genes estudados a partir de processo de transcrição *in vitro*. Os genes se encontram clonados no vetor pGEM-T easy que contém os promotores SP6 e T7 flanqueando o poly-linker. A síntese de RNAs se dará pela ativação do promotor SP6 e do T7 em reações separadas segundo as instruções da Biolabs, fornecedor das enzimas SP6 e T7 polimerase. Após esta síntese *in vitro* as duas fitas serão aneladas segundo protocolo descrito por Elbashir *et al.*, 2002. Os dsRNAs serão então introduzidos em fito-nematóides pela técnica de soaking descrita por Tabara *et al.*, 1998. Alternativamente também serão utilizados dsRNAs de 21 nucleotídios que serão adquiridos da Invitrogen e utilizados pela técnica de soaking.

Silenciamento de genes potencialmente envolvidos com a fitopatogenicidade de nematóides por expressão de RNAi em plantas transgênicas.

Fragmentos de aproximadamente 500pb dos genes de fitopatogenicidade (quinase putativa e fator de transcrição putativo) serão subclonados inicialmente no vetor de origem pDONR™221 do kit de clonagem "PCR Cloning System with Gateway® Technology" e em seguida transferidos por recombinação para o vetor de destino p*7GWIWG2(I) para a expressão de dsRNA em plantas. As construções obtidas serão então utilizadas para transformação de *Arabidopsis thaliana* pelo método de infiltração do botão floral via *Agrobacterium tumefaciens*. As plantas transgênicas serão inoculadas com juvenis de segundo estágio de *M. incognita* (J2). As análises das raízes inoculadas serão realizadas

por cortes histológicos para avaliação estrutural dos sítios de alimentação e o silenciamento gênico nos nematóides será avaliado por Real Time PCR para análise da abundância de transcritos.

Transformação de Arabidopsis thaliana e análise histológica das raízes.

Para avaliar o papel das proteínas de secreção na formação dos sítios de alimentação de *M. incognita*, os genes subclonados no vetor pDONR™221 serão transferidos por recombinação para o vetor de destino para a expressão em plantas das proteínas em fusão N-terminal com GFP (pMDC85). As construções obtidas serão então utilizadas para transformação de *Arabidopsis thaliana* pelo método de infiltração do botão floral via *Agrobacterium tumefaciens*. A análise fenotípica dos transformantes será realizada após a confecção de lâminas histológicas das raízes e a localização subcelular das proteínas expressas será analisada pela fluorescência emitida pela GFP utilizando um microscópio confocal.

RESULTADOS PARCIAIS

A partir das reações de amplificação realizadas, foram obtidas duas bandas de tamanho esperado (aproximadamente 500pb) para os genes Mi 1(putativa quinase) e Mi 7(putativo fator de transcrição), em uma reação de PCR, utilizando um gradiente de 35°C a 55°C. O gene Mi 1 foi amplificado a temperatura de 45 °C e o gene Mi 7 a temperatura de 50°C (Figura – 02).

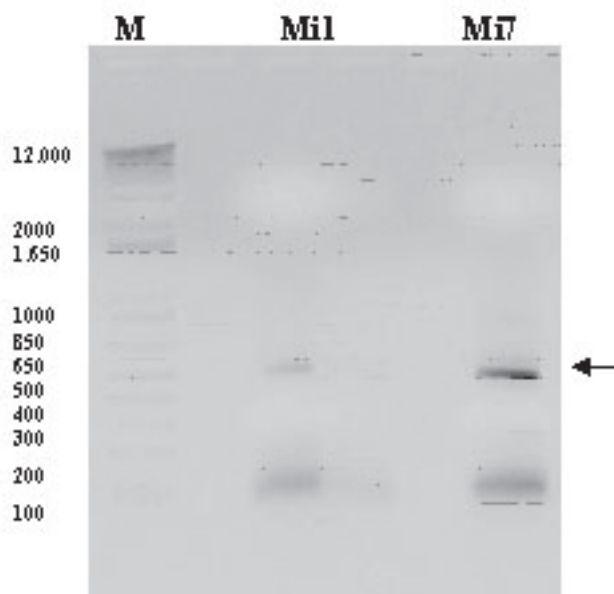


Figura 02 – Gel de agarose 1% mostrando a amplificação de bandas de tamanho esperado para os genes Mi 1 e Mi 7 de glândulas esofagianas de *M. incognita*.

As bandas foram então cortadas do gel e o DNA correspondente foi purificado utilizando o kit GENE CLEAN II (Q – Biogene). Os genes foram então ligados ao vetor pGEM* -T Easy e o produto da ligação foi utilizado para transformar *Escherichia coli* via eletroporação. As colônias positivas foram crescidas em meio LB-AMP e o DNA do inoculo foi purificado usando o kit de mini-prep da Quiagen. Após diálise, o material foi enviado para o seqüenciamento onde as seqüências dos genes Mi 1 e Mi 7 foram confirmadas (Figura 03).

Mi1	GCAGGCGATCGAAGCGCTTCAACCTCTACTGGTTGTACAACTATTTTGGATGCTAGAT	60	Mi7	GCAGGCGATCGAAGCGCTTCAACCTCTACTGGTTGTACAACTATTTTGGATGCTAGAT	60
Mi1A	GCAGGCGATCGAAGCGCTTCAACCTCTACTGGTTGTACAACTATTTTGGCTTGTGAT	60	Mi7A	GCAGGCGATCGAAGCGCTTCAACCTCTACTGGTTGTACAACTATTTTGGCTTGTGAT	60
Mi1	CATCGGGATACCAAGGAAAAAATAACAAAAAAGAACTTTCAACCCCAACGATAAAACATA	120	Mi7	CATATAGGGAAATTCGCCAGCAAAACCAACCAACGATGACAAAACTCTAAAA	120
Mi1A	CATCGGGATACCAAGGAAAAAATAACAAAAAAGAACTTTCAACCCCAACGATAAAACATA	120	Mi7A	CATATAGGGAAATTCGCCAGCAAAACCAACCAACGATGACAAAACTCTAAAA	120
Mi1	TCCAACTCTTGCAGTGTATGGTGGGCAAGTTTCAGCAATACCTCGGTGGCTTGGTT	180	Mi7	ATGCTGGAAATGTTCAAACTTCAAACTACTCAAGTGACATTACAACTAGCTGGGCA	180
Mi1A	TCCAACTCTTGCAGTGTATGGTGGGCAAGTTTCAGCAATACCTCGGTGGCTTGGTT	180	Mi7A	ATGCTGGAAATGTTCAAACTTCAAACTACTCAAGTGACATTACAACTAGCTGGGCA	180
Mi1	GTGGGTGATGAGGTGTATGTATGGCTAAGACAGAGGTTTCAGGCGATTCGCGAATCGGC	240	Mi7	GAGCTTTGACCGTTAAATTAATAATGCGAAACCAATATAAATACCGAGATGAA	240
Mi1A	GTGGGTGATGAGGTGTATGTATGGCTAAGACAGAGGTTTCAGGCGATTCGCGAATCGGC	240	Mi7A	GAGCTTTGACCGTTAAATTAATAATGCGAAACCAATATAAATACCGAGATGAA	240
Mi1	TACGATGCGTTGACTGGATCAATGAAATTTATCATTCTGATAATATTATTGTTGAGTT	300	Mi7	TAAATGGAAATTAATTTTCAAACTGAAAAAGAACTGAAATTTCTGCTTATTGAA	300
Mi1A	TACGATGCGTTGACTGGATCAATGAAATTTATCATTCTGATAATATTATTGTTGAGTT	300	Mi7A	TAAATGGAAATTAATTTTCAAACTGAAAAAGAACTGAAATTTCTGCTTATTGAA	300
Mi1	CCATTGGAAGCGTTTTTTCTTCCACGACAACAAGTGTGTCATCCAGCTTGTAGGCTAC	360	Mi7	CTGTTCCATTATTTCTGAAATAAGTGTGTTATGAACTTGACACTTATAACAGGAA	360
Mi1A	CCATTGGAAGCGTTTTTTCTTCCACGACAACAAGTGTGTCATCCAGCTTGTAGGCTAC	360	Mi7A	CAGCTTAAATGTTTTCTGAAATAAGTGTGTTATGAACTTGACACTTATAACAGGAA	360
Mi1	GATATTAAGCTAATAAATCTCTTCAAAATTAATGATGTCGACTTCAAAATGTCCT	420	Mi7	ACCCATGAACTAACTTAAATTAATGAAATTAATTTATGATTAAGAAAGGAGGTT	420
Mi1A	GATATTAAGCTAATAAATCTCTTCAAAATTAATGATGTCGACTTCAAAATGTCCT	420	Mi7A	ACCCATGAACTAACTTAAATTAATGAAATTAATTTATGATTAAGAAAGGAGGTT	420
Mi1	ACTGATAAGAAATTTCCCGAAGGCTGTACTATGAAATGTGA-----	465	Mi7	AATGTGCAATTAAGTGTGTTGAAAGCTAATACTGTTAA-----	465
Mi1A	G-TGAAAGAAATTTCCCGAAGGCTGTACTATGAAATGTGA-----	465	Mi7A	AGTGTGCAATTAAGTGTGTTGAAAGCTAATACTGTTAA-----	465

FIGURA 03 – Resultado do seqüenciamento confirmando as seqüências dos genes Mi 1 e Mi 7, onde Mi 1A e Mi 7A correspondem ao DNA que foi enviado ao seqüenciamento.

PERSPECTIVAS

A partir dos genes obtidos, estes serão sub-clonados em vetores binários de *A. tumefaciens* para realizar transformação genética de *A. thaliana*. Adicionalmente, está sendo feita a sub-clonagem no vetor pKannibal para a expressão de RNA interferente em *A. thaliana*, além dos experimentos de transcrição in vitro para a aplicação da técnica de soaking. Ao final deste trabalho, espera-se obter plantas com fenótipos alterados resultantes do efeito da expressão dos genes de interesse. Por outro lado, a técnica de soaking e as plantas transformadas com o RNA interferente permitirão avaliar o efeito do silenciamento dos genes de interesse na fisiologia normal dos nematóides e das células gigantes por eles formadas. Efeitos como morte dos nematóides, diminuição da fecundidade, destruição ou inibição dos sítios de alimentação, permitirão definir quais genes podem funcionar como alvo para estratégias de obtenção de plantas transgênicas resistentes a meloidoginose.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALDWIN, J.G.; NADLER, S.A.; ADAMS, B.J. Evolution of plant parasitism among nematodes. **Annual review phytopathology**, 42: 83-105. 2004.
- DAUTOVA, Z.A.; VAVILOVA, O.V.; AZNABAEV, M.T.; SURKOVA, V.K.; NEFED'EV, K.V.; BASCHENKO, I.A., SIGAEVA, N.N. High performance liquid chromatography identification of chloracetophenone in ocular tissues in burns induced by gas balloons (an experimental study). **Vestn oftalmology**, 117(1): 29-30. 2001.
- DAVIS, E.L., HUSSEY, R.S., BAUM, T.J., BAKKER, J., SCHOTS, A., ROSSO, M.N. AND ABAD, P. (2000) Nematode Parasitism genes. **Annu. Rev. Phytopathol.** 38,365–396. 2000.
- DOYLE, E.A., LAMBERT, K.N. *Meloidogyne javanica* chorismate mutase 1 alters plant cell development. Molecuysen, **MolecularPlant Microbe Interactions** 16: 123-131. 2003.
- ELBASHIR SM, HARBORTH J., WEBER K., TUSCHLA T. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. **Methods** 26: 199–213. 2002.
- GAO, B.; ALLEN, R. MALIER, T.; DAVIS, E.L.; BAUM, T.J., HUSSEY, R.S. The parasitome of the phytonematode *Heterodea glycines*. **Molecular Plant-microbe interactions**– 05. 2003.
- GOELLNER, J.R., CAUDILL, J.L. Intranuclear holes (cytoplasmic pseudoinclusions) in parathyroid neoplasms, or “holes happen”. **Cancer**, 90(1): 41-46. 2000.
- GOELLNER, M.; WANG, X., DAVIS, E.L. Endo-beta-1,4-glucanase expression in compatible plant-nematode interactions. **Plant Cell**, 13(10): 2241-2255. 2001.
- GOVERSE, A.; VOORT, R.V.D.; VOORT, C.R.V.D.; KAVELAARS, A.; SMANT, G.; SCHOTS, A.; BAKKER, J., HELDER, J. Naturally induced secretations of the potato cyst nematode co-stimulate the proliferation of both tobacco leaf protoplasts and human peripheral blood mononuclear cells. **Molecular plant-microbe interactions**, 12: 872-881. 1999.

GOODRIDGE, H.S., DEEHAN, M.R., HARNETT, W., HARNET, M.M. Subversion of immunological signaling by a filarial nematode phosphorycholine-containing secreted product. **Cellular Signalling**, 17: 11-16, 2005.

HUANG, G, B. GAO, T. MAIER, R. ALLEN, E. L. DAVIS, T. J. BAUM, R. S. HUSSEY. A profile of putative parasitism genes expressed in the esophageal gland cells of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 16:376-381, 2003.

HUSSEY, R.S., BARKER, A. A. Comparison methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. **Plant Disease Reporter**, v.57, p.1025-1028, 1973.

JONES, J.T., FURLANETTO, C., BAKKER, E., BANKS, B., BLOK, V., CHEN, Q., PHILIPS, M., PRIOR, A. Characterization of a chorismate mutase from the potato cyst nematode *Globodera pallida*. **Molecular Plant Pathology**, 4 : 43-50, 2003.

JAUBERT, S.; LEDGER, T.N.; LAFFAIRE, J.B.; PIOTTE, C.; ABAD, P., ROSSO, M.N. Direct identification of stylet secreted proteins from root-knot nematodes by a proteomic approach. **Molecular Biochemistry Parasitology**, 121(2):205-11. 2002.

LAMBERT, K.N., ALLEN, K.D., SUSSEX, I.M. Cloning and characterization of an esophageal-gland-specific chorismate mutase from the phytoparasitic nematode *Meloidogyne javanica*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 12: 328-336. 1999.

LILLEY, C.J.; URWIN, P.E., ATKINSON, H.J. Characterization of plant nematodes genes: identifying target for a transgenic defence. **Parasitology** 118: S630-S72. 1999.

OPPERMAN, C.H., BIRD, D.M. The soybean cyst nematode, *Heterodera glycines*: a genetic model system for the plant-parasitic nematodes. **Molecular plant-microbe interaction** 1: 342-346. 1998.

POPEIJUS, H.; OVERMARS, H.; JONES, J.; BLOK, V.; GOVERSE, A.; HELDER, J.; SCHOTS, A.; BAKKER, J., SMANT, G. Degradation of plant cell walls by a nematode. **Nature**, 6; 406(6791): 36-37. 2000.

ROSSO, M.N.; FAVERY, B.; PIOTTE, C.; ARTHAUD, L.; DE BOER, J.M.; HUSSEY, R.S.; BAKKER, J.; BAUM, T.J., ABAD P. Isolation of a cDNA encoding a beta-1,4-endoglucanase in the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* and expression analysis during plant parasitism. **Molecular plant microbe interaction**, 12(7):585-91. 1999.

SMANT, G.; STOKKERMANS, J.P.; YAN, Y.; DE BOER, J.M.; BAUM, T.J.; WANG, X.; HUSSEY, R.S.; GOMMERS, F.J.; HENRISSAT, B.; DAVIS, E.L.; HELDER, J.; SCHOTS, A., BAKKER, J. Endogenous cellulases in animals: isolation of beta-1, 4-endoglucanase genes from two species of plant-parasitic cyst nematodes. **Proceeding of the National Academy of Science USA**, 95(9): 4789-4790. 1998.

URWIN, P.E.; LILLEY, C.J., ATKINSON, H.J. Ingestion of double-stranded RNA by preparasitic juvenile cyst nematodes leads to RNA interference. **Molecular plant-microbe interaction** 15: 747-752. 2002.

WANG, X.; MEYERS, D.; YAN, Y.; BAUM, T.; SMANT, G.; HUSSEY, R., DAVIS, E. In planta localization of a beta-1,4-endoglucanase secreted by *Heterodera glycines*. **Molecular plant-microbe interaction**, 12(1): 64-67. 1999.

YATSUDA, A.P., KRIJGSVELD, J., CORNELISSEN, A.W.C.A., HECK, J.R., DE VRIES, E. Comprehensive Analysis of the Secreted proteins of the Parasite *Haemonchus contortus* Reveals Extensive Sequence Variation and Differential Immune Recognition. **The Journal of Biological Chemistry**, 278 (19): 16941-16951, 2003.

YAN, Y.; SMANT, G.; DAVIS, E. Functional screening yields a new beta-1,4-endoglucanase gene from *Heterodera glycines* that may be the product of recent gene duplication. **Molecular plant-microbe interaction**, 14(1): 63-71. 2001.

21 - O PROPEPTÍDEO DE CISTEÍNA-PROTEINASE INFLUENCIA O DESENVOLVIMENTO DO NEMATÓIDE DE CISTO DA SOJA, *Heterodera glycines*

Marra, B.M.^{1,2}; Batista, J.A.N.¹; Silva, F.B.³; Del Sarto, R.P.^{1,4}; Figueira, E.L.Z.¹; Souza, D.S.L.^{1,2}; Sá, C.M.² e Grossi-de-Sá, M.F.¹

¹Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia; ²Universidade de Brasília; ³Universidade Católica de Brasília; ⁴Faculdade da Terra de Brasília, Brasília, DF.

RESUMO

A cultura da soja é afetada por diversas pragas e patógenos, incluindo o nematóide de cisto *Heterodera glycines*. Como as enzimas proteolíticas são essenciais no processo de alimentação deste nematóide, estas são alvos potenciais no controle deste patógeno. Com o objetivo de avaliar o potencial do propeptídeo da proteinase cisteínica HGCP-Iv como alternativa de controle do nematóide de cisto da soja, vetores com a região-pro deste gene sob o controle do promotor CaMV35S (p100HG) e do CaMV modificado (4xB5+A) foram usados para transformar raízes de soja (cultivar: 'Br16') via *Agrobacterium rhizogenes* ("strain" 2659), demonstrando eficiência de transformação de até 70%. A sequência da região-pro foi também expressa em sistema heterólogo de *Escherichia coli* e a proteína recombinante foi utilizada na produção de anticorpo policlonal em camundongos. As raízes transformadas, expressando o propeptídeo, foram detectadas por 'western-blot', atingindo níveis de até 24% de frequência na transformação. O nível de expressão deste peptídeo também foi quantificado pela técnica de ELISA. Os bioensaios demonstraram redução significativa no número de fêmeas, no número de ovos por fêmea e na largura das fêmeas de *H. glycines* em raízes de soja expressando o propeptídeo, PROHGCP.

INTRODUÇÃO

A cadeia produtiva da soja no Brasil movimenta bilhões de reais por ano e contribui enormemente ao superávit primário. Entretanto, a cultura sofre danos por pragas e patógenos, destacando o fitonematóide, *Heterodera glycines*. O elevado custo anual com as práticas de manejo e o controle de fitonematóides vêm estimulando a busca de estratégias eficientes para a sustentabilidade do sistema de produção e do meio ambiente. Estratégias como a rotação de culturas e o uso de cultivares resistentes têm sido usados, demonstrando bons resultados. Considerando a dificuldade de se desenvolver cultivares resistentes a estes patógenos através do melhoramento clássico, torna-se necessária à utilização de outras formas de controle como o desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas contendo genes exógenos com efeito nematocida. A incorporação de genes, expressando inibidores de proteinases com atividade nematocida em cultivares economicamente importantes é um método de controle alternativo. A região-pro das proteinases tem sido relatada como efeito semelhante a um inibidor, inibindo sua própria proteinase, sugerindo grande potencial de uso no controle de insetos-praga e de fitonematóides. Os propeptídeos são inibidores específicos e seletivos, e quando expressos de maneira estável na planta, podem contribuir para o sucesso do desenvolvimento de culturas transgênicas relacionadas ao controle de fitonematóides, como o *H. glycines*. Recentemente, Silva *et al.* (2004) relataram a inibição *in vitro* da atividade da proteína madura pelo seu propeptídeo (PROHGCP). Portanto, torna-se necessário conhecer o efeito *in vivo* deste propeptídeo sobre a infecção, desenvolvimento e reprodução do nematóide.

MATERIAL E MÉTODOS

Expressão da região-pro e produção do anticorpo

O propeptídeo expresso em *E. coli* (linhagem BL21 DE3) foi parcialmente purificado e utilizado para produzir antisoro policlonal em camundongo conforme Silva *et al.*, (2004). O antisoro recolhido foi testado por *Western-Blot* segundo Marcellino e Grossi-de-Sá (1998).

Construções para expressão da PROHGCP em raízes de soja

As construções para expressão gênica em raízes de soja foram feitas através da subclonagem da região-pro, em vetores binários da série pGPTV-Kan (Becker *et al.*, 1992). As construções foram feitas sob o controle do promotor CaMV35S nativo (p100Hg) ou com uma forma truncada com o subdomínio B5 repetido 4 vezes em “tandem”, p54Hg (Batista, 2001).

Transformação de raízes de soja

O linhagem 2659 (família cucumopina) de *Agrobacterium rhizogenes* selecionado recebeu as construções de vetores para expressão da região-pro (p54HG ou p100HG) por eletroporação conforme Lacorte e Romano (1998), e cresceram em meio Luria-Bertani (LB) a 28°C com aeração até atingir a densidade ótica (600 nm) entre 0,5 e 1,0. Foram adicionados 100 mg.ml⁻¹ de kanamicina no meio de crescimento em que havia a linhagem transformada com o vetor de expressão. Os cotilédones de soja (cultivar Br 16) destacados das plântulas e riscados com bisturi na face abaxial foram imersos no meio LB com *A. rhizogenes* conforme Savca *et al.* (1990). Os cotilédones foram colocados em meio MXB com adição de claforan (500 mg.ml⁻¹) e kanamicina (100 mg.ml⁻¹).

Estabelecimento da cultura de raízes de soja transformadas

Raízes adventícias surgiram conforme sintoma de raízes em “cabeleira”. Quando o primórdio radicular ultrapassou 5-7 cm, foi destacado do cotilédone e transferido para placa de Petri com meio MXB e antibiótico.

Análise e detecção de raízes de soja transformadas expressando o propeptídeo

Parte de cada raiz transformada (0,5 g) foi utilizada na obtenção de extrato protéico total para análise de *Western-Blot* segundo Marcellino e Grossi-de-Sá, (1998). O nível de expressão do propeptídeo foi estimado por ensaio imunoenzimático (ELISA) conforme Aragão e Ribeiro (1998), nas raízes transformadas pela relação do total de PROHGCP com o total de proteínas do extrato obtido das raízes transformadas. Como controles foram utilizados o propeptídeo purificado, extrato protéico de raiz não transformada e extrato protéico de raiz transformada sem os vetores. Cada alíquota de 100 ng de proteínas totais do extrato de raiz foi analisada em triplicata.

*Análise do efeito da PROHGCP sobre o nematóide *Heterodera glycines**

Os juvenis de segundo estágio (J2) axenizados segundo Lawn e Noel (1986) foram inoculados nas extremidades dos sistemas radiculares das raízes de soja transformada com os vetores p54HG ou p100HG. Como controle positivo foi usado raiz transformada sem os vetores. As raízes infectadas foram mantidas em placas de Petri com meio MXB no escuro a 26°C. A avaliação do número de fêmeas, número de ovos por fêmea, comprimento e largura das fêmeas foi 25 dias após a inoculação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

*Expressão da PROHGCP em *E. coli* e produção de anticorpos*

O propeptídeo expresso em *E. coli* após a adição de IPTG e purificação parcial pode ser observado na figura 1 conforme Silva *et al.*, (2004). A proteína recombinante PROHGCP (antígeno) foi imunogênica naqueles animais que receberam a proteína excisada do gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

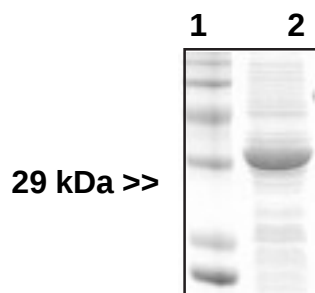


Figura 1: Análise por SDS-PAGE da expressão da PROHGCP em *Escherichia coli*: (1) marcador molecular (kDa), (2) fração parcialmente purificada da PROHGCP recombinante após 3 h de indução com IPTG.

Transformação de raízes de soja

Aproximadamente 10 dias após a infecção dos cotilédones surgiram calos de tecido globular e primórdios radiculares. Cerca de 20 dias depois de destacado do cotilédone, o sistema radicular se encontrava estabelecido em placa de Petri com meio MXB. A taxa de crescimento média foi de 0,1-0,3 cm por 24 h. A maioria das raízes estabelecidas apresentou crescimento plagiotrópico e não exibiu diferenças fenotípicas na taxa de crescimento e morfologia da raiz. A linhagem 2659 induziu raízes transformadas em até 70% dos cotilédones infectados, enquanto a linhagem 2659 + p100HG foi a mais eficiente e a linhagem 2659+p54HG apresentou níveis de até 16% de frequência na indução de raízes. A eficiência de transformação utilizando os vetores de expressão foi menor quando comparado com a linhagem sem os vetores.

Deteção e análise das raízes de soja transformadas expressando PROHGCP

As análises de *Western-Blot* e ELISA permitiram a detecção das raízes que expressavam a PROHGCP e a quantificação do nível de expressão deste peptídeo, respectivamente. Como controle positivo foi usado o propeptídeo expresso em *E. coli*. Não houve sinal na membrana quando foi utilizado o extrato total de *E. coli* (linhagem BL21 DE3) sem a construção de vetor e extrato protéico de raiz transformada sem o vetor. A frequência de raízes transformadas expressando o propeptídeo foi de até 24% do total de raízes transformadas utilizando a linhagem 2659 e o vetor p100HG.

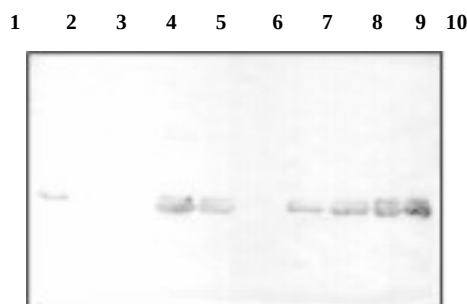


Figura 2: Análise de *Western-Blot* das raízes transformadas com o soro anti-PROHGCP: (1) propeptídeo

O ensaio de *Western-Blot* das raízes transformadas expressando a PROHGCP detectou apenas duas bandas muito próximas, demonstrando a especificidade do anticorpo policlonal. A primeira banda (superior) corresponde a PROHGCP e a segunda banda (inferior) provavelmente trata-se de uma degradação do propeptídeo na planta. Outro fator importante que deve ser analisado ainda é a estabilidade do propeptídeo (PROHGCP) na planta. Futuramente, pode-se explorar o aumento da estabilidade da molécula na planta utilizando moléculas de tioredoxina ou apiteno (BSA) no vetor binário. A quantidade de PROHGCP expresso foi estimada pelo teste de ELISA, atingindo níveis de até 0,308 % do total de

proteínas das raízes. Não houve diferença significativa ao nível de 5% de significância pelo teste de médias entre as quantidades de PROHGCP expressos pelos vetores p100HG ou p54HG.

Análise do efeito do propeptídeo sobre o nematóide Heterodera glycines

Aproximadamente 3-4 semanas após a infecção dos J2, foram detectadas fêmeas maduras nas raízes. A taxa de desenvolvimento das fêmeas foi em média 23 %, sendo que 5-56 fêmeas foram observadas em cada sistema radicular. Houve diferença significativa ao nível de 5% de significância pelo Teste de Tukey quanto ao número de fêmeas, quanto ao número de ovos por fêmea e largura das fêmeas nos tratamentos com os diferentes vetores. A quantidade do propeptídeo expresso foi correlacionado com o número de fêmeas e o número de ovos por fêmea e apesar de não ser significativo ao nível de 5% entre as três variáveis, o coeficiente de correlação ($R = -0,480$) negativo sugere que quanto maior o nível de expressão de PROHGCP, menor o número de fêmeas e ovos por fêmea. A redução no número de ovos foi de até 58%, no número de fêmeas por sistema radicular foi de até 31%.

	Fêmeas	Ovos	%PRO	Comprimento fêmea (μm)	Largura fêmea (μm)
controle	43,68 a	99,2 a	0 b	282,4 a	184,4 a
p54HG	43,04a	59,6 b	0,08856 a	273,6 a	182,4 a
p100HG	30,12 b	41,56 c	0,13774 a	256,8 a	159,6 b
CV	29%	36%	35%	38%	32%

- médias seguidas da mesma letra não se diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de significância. - CV: coeficiente de variação

A redução significativa de ovos também foi observado por Urwin *et al.* (1995), quando o inibidor de cisteína de arroz em batata reduziu o número de ovos e o tamanho de fêmeas de *Globodera pallida*. A diminuição no número de ovos também pode ser uma estratégia promissora no controle deste patógeno, considerando que o cisto é a principal estrutura de disseminação e resistência do fitonematóide. Portanto, a possibilidade de se obter plantas geneticamente modificadas de soja expressando inibidor de proteinases (propeptídeos) com características agronomicamente desejáveis e com resistência a nematóide existe.

PERSPECTIVAS

Obtenção de uma cultivar de soja eficiente no controle deste patógeno. Entretanto, ainda devem ser estudados a estabilidade e o aumento no nível de expressão do propeptídeo na planta, utilizando promotores mais eficientes. Devido a possibilidade do propeptídeo inibir proteinases da planta, testes para detecção de atividade inibitória estão sendo executados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAGÃO, J.L.A.; RIBEIRO, S.G. Detecção de proteínas pela técnica de ELISA. Cap-16 *in* **Manual de transformação genética de plantas** (Brasileiro, A.C. & Carneiro, V.T.C.). Embrapa. 1998.
- BATISTA, J.A.N. **Relatório de bolsa recém-doutor**: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). 2001.
- BECKER, D.; LUTTICKE, R.; LI, M.; STARLINGER, P. Control of excision frequency of maize transposable element Ds in Petunia protoplasts. **Proceeding National. Academy. Science.** U S A, v. 12, p. 5552-5556, 1992.

LACORTE, C.; ROMANO, E. Transferência de vetores *Agrobacterium*. Cap-6. *in: Manual de transformação genética de plantas* (Brasileiro, A.C. & Carneiro, V.T.C.). Embrapa. 1998. Brasília, DF.

LAWN, D.A.; NOEL, G.R. Gnotobiotic culture of *Pratylenchus scribneri* on carrot discs. **Nematropica**, v.16, p. 45-51, 1986.

MARCELLINO, L.H.; GROSSI-DE-SÁ, M.F. Detecção e análise de proteínas pela técnica western blot. Cap-17. *in: Manual de transformação genética de plantas* (Brasileiro, A.C. & Carneiro, V.T.C.). Embrapa. 1998.

SAVCA, M.A.; RAVILLION, B.; NOEL, G.R.; FARRAND, S.K. Induction of hair roots cultivated soybean genotypes and their use to propagate the soybean cyst nematode. **Phytopathology**, v.80, p. 504-508. 1990.

SILVA, F. B., BATISTA, J. A. N., MARRA, B. M., FRAGOSO, R. R., MONTEIRO, A. C. D. S., FIGUEIRA, E. L. ZA, GROSSI-DE-SÁ, M. F. Prodomain peptide of the HGCP-Iv cysteine proteinase inhibits nematode cysteine proteinases. **Genetics and Molecular Research**. www.funpecrp.com.br/gmr/index: , v..3, n..3, p.342 - 355, 2004.

URWIN, P.E.; ATKINSON, H.J; WALLER, D.A.; MCPHERSON, M.J. Engineered oryzacystatin-I expressed in transgenic hairy roots confers resistance to *Globodera pallida*. **Plant Journal**, v. 1, p.121-31. 1995.

22 - SELEÇÃO DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS A PROTEÍNAS DE SECREÇÃO DO NEMATÓIDE DE GALHA DE RAIZ (*Meloidogyne incognita*)

Lima, L.M.^{1,2}; Guimarães, L.M.¹; Vieira, P.M.M.M.²; Carneiro, R.M.D.G.¹; Batista, J.A.N.¹; Silva, M.S.¹; Maranhão, A.Q.²; Brígido, M.M.² e Grossi-de-Sá, M.F.¹

¹EMBRAPA – Recursos Genéticos e Biotecnologia; ²Departamento de Biologia Celular, UnB.

RESUMO

Nematóides fitoparasitas são pragas importantes da agricultura, causadores de doenças em muitas culturas de importância econômica. Estratégias biológicas visando o controle desses nematóides vêm sendo desenvolvidas, uma delas consiste em selecionar anticorpos a partir de biblioteca de *phage display*, com potencial no reconhecimento de proteínas envolvidas no parasitismo de plantas. Proteínas de nematóides no estágio infectivo J2 foram inoculadas em galinhas para gerar uma gama de fragmentos de anticorpos scFv contra essas proteínas. A biblioteca construída gerou $1,4 \times 10^7$ formas diferentes de fragmentos, sendo estes, clonados no vetor pComb3XSS. Após cinco ciclos de seleção contra proteínas de nematóides, foi obtido o enriquecimento de formas ligantes, sendo, posteriormente, confirmado pelo teste de ELISA. Os clones selecionados foram seqüenciados e analisados. As regiões das CDRs (regiões determinantes de complementaridade) das cadeias leve e pesada dos anticorpos foram determinadas e seis diferentes formas de scFv foram selecionadas. Esses fragmentos de scFv de galinha obtidos representam uma poderosa ferramenta para o estudo de proteínas de nematóides envolvidas no fitoparasitismo.

INTRODUÇÃO

Os fitonematóides formadores de galhas (*Meloidogyne* spp.) são descritos atacando grande número de culturas e provocando prejuízos econômicos de bilhões de dólares à agricultura mundial, implicando na redução de alimentos produzidos. Dentre os nematóides que causam problemas a agricultura, a espécie *Meloidogyne incognita* é a mais importante economicamente, por ser capaz de se reproduzir em mais de 2000 espécies de plantas (Jung e Wyss, 1999). Esses nematóides têm uma relação altamente complexa com seus hospedeiros, modificando as células das raízes para formar sítios de alimentação, sobre os quais os nematóides dependem para sobrevivência (Bird, 1992). Todos os nematóides parasíticos de plantas usam uma lança retrátil, chamada estilete, para penetrar na parede da célula da planta, injetando secreções glandulares dentro da célula e recolhendo nutrientes do citoplasma (Hussey *et al.*, 2002). Essas secreções podem ter um importante papel na patogenicidade, provavelmente, auxiliando na penetração e migração do segundo estágio juvenil (J2) no tecido da planta, na modificação e manutenção das células das plantas, que atuam como células alimentadoras, e na digestão do conteúdo da célula hospedeira para facilitar a aquisição de nutrientes pelos nematóides (Smant *et al.*, 1998).

Conhecer a natureza e a função das moléculas que compõem as secreções dos nematóides é um ponto de maior importância para o entendimento da relação parasítica dos nematóides nas plantas, e ainda, encontrar alvos que possam ser utilizados via engenharia genética para o controle desses parasitas. Este trabalho teve como objetivo a construção de uma biblioteca de fragmentos de anticorpos (scFv), expressos na superfície de fagos (*Phage display library*), específicos às proteínas de secreção envolvidas no fitoparasitismo de nematóides.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Biológico

Ovos de *M. incognita* foram produzidos em plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* L.). As massas de ovos foram coletadas das raízes de acordo com Hussey e Barker (1973). Após eclosão os J2 foram coletados e feito a extração das proteínas totais.

Animais e produção de anticorpos

Cinco galinhas da raça *White Leghorn* foram utilizadas para a produção de anticorpos. As galinhas receberam extrato total de proteínas acrescido do Reagente de Freud's Adjuvante Completo. As doses subseqüentes foram acrescidas do reagente de Freud's Adjuvante Incompleto, em um total de cinco doses. A resposta imune foi monitorada por ELISA. Os animais foram sacrificados sete dias após a 5ª injeção e coletado os baços, os quais foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido para posterior extração de RNA.

Extração de RNA

A extração de RNA seguiu o protocolo descrito no kit TRIzol Reagent – Total RNA isolation Reagent (Gibco BRL).

Síntese de cDNA

Para a síntese de cDNAs, a partir de RNAs dos baços, foi utilizado o Acess Quick RT-PCR System (Promega) e o primer oligo(dT)₁₂₋₁₈.

Síntese dos fragmentos de scFv

Uma reação de PCR foi montada para a amplificação da primeira fita de DNA dos fragmentos das cadeias pesada (V_H) e leve (V_L) dos anticorpos. Para o segundo ciclo de PCR (overlap extension), os produtos apropriados da primeira reação de PCR foram misturados para gerar um produto sobreposto de 750pb correspondendo aos genes de scFv. Foram utilizados os primers e as condições descritas por Barbas III *et. al.* (2001).

Obtenção da biblioteca de scFv de galinha

De acordo com o protocolo descrito por Barbas III *et. al.* (2001). Os clones foram expressos na superfície de fagos filamentosos e selecionados contra proteínas de secreção do nematóide *M. incognita*. Os clones selecionados foram seqüenciados para confirmação dos genes de scFv. As seqüências foram analisadas e as regiões das CDRs determinadas.

Expressão dos clones selecionados

Os genes selecionados após a análise do sequenciamento foram expressos em células competentes TOP 10F' induzidos por IPTG. A caracterização desses anticorpos está sendo realizada.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após completar o tempo de imunização das galinhas, os RNAs foram extraídos de três baços e em seguida foi feito a síntese de cDNAs. As regiões variáveis dos anticorpos foram amplificadas por PCR e uma biblioteca de cDNAs foi construída utilizando o vetor pComb3XSS. O tamanho da biblioteca foi determinado, ou seja, o número total de transformantes independentes foi calculado em $1,4 \times 10^7$. Os clones foram selecionados após cinco ciclos de seleção, sendo obtido o enriquecimento no 3º ciclo e posteriormente confirmado por teste de ELISA.

Clones individuais expressando scFv foram selecionados no 3º ciclo de seleção por *dot blot* e encaminhados para seqüenciamento para análise do grau de heterogeneidade da biblioteca. As seqüências foram analisadas utilizando o programa BLASTX e as

seqüências de aminoácidos foram deduzidas utilizando o programa BioEdit e alinhadas pelo Clustalw. Análises detalhadas das seqüências foram feitas para determinar o número de clones diferentes selecionados, bem como as similaridades e as diferenças entre estes. O alinhamento permitiu identificar seis anticorpos diferentes e as análises das CDRs, segundo Kabat, mostraram uma alta variabilidade das cadeias leves. Não foi observado uma alta variabilidade nas CRDs das cadeias pesadas (tabela 1). Todavia, conclusões mais acuradas destes resultados só poderão ser obtidas após a caracterização destes anticorpos.

Tabela 1 – Seqüências preditas dos aminoácidos que compõem as CDRs das cadeias leve e pesada dos anticorpos de galinha (L – cadeia leve; H – cadeia pesada)

Clone	CDR L1	CDR L2	CDR L3	CDR H1	CDR H2	CDR H3
C2	SGGSGSYG	SNNQRPSN	GSFDRTGGNVSI	GFTFSDRGMC	SNTGRHTKYG	GTSGYSNSVGEIDV
C5	SGGYSGYG	DNTNRPSD	GSYDSSAGYVAI	GFTFSDRGMV	SNTGRHTKYG	GTSGYSNSVGEIDV
C11	SGGYNY	NNDKRPSD	GAYDNTEAYAGI	GFTFSDRGMV	SGSSGRTHKYG	GTSGYSNSVGEIDV
F5	SGTSGNYG	YNDKRPSN	GSFDRTGGNVGI	GFTFSDRGMV	SNTGRHTKYG	GTSGYSNSVGEINV
B1	SGSNVYGYG	ANTNRPSN	GGYDDSTGGNVGI	GFTFSDRGMV	SNTGRHTKYG	GTSGYSNSVGEIDV
G12	SGGSGSYG	SNNQRPSN	GSFDRTGGNVGI	GFTFSDRGMV	SNTGRHTKYG	GTSGYSNSVGEIDV

Os fragmentos de anticorpos scFv (single chain fragment variable) são polipeptídeos recombinantes formados apenas pelos domínios variáveis das cadeias leve e pesada, os quais são covalentemente ligados por um peptídeo sintético. Estes fragmentos representam as menores moléculas com sítio de ligação ao antígeno e possuem a mesma afinidade dos anticorpos parentais (Rosso *et. al.*, 1996). Recentes pesquisas vêm sendo desenvolvidas introduzindo anticorpos modificados em plantas com o objetivo de tornar a planta resistente a pragas ou patógenos e algumas dessas pesquisas demonstraram que as plantas transformadas expressam uma quantidade substancial de anticorpos, e estes continuam funcionais e com poder de reconhecimento ao antígeno de interesse (Firek *et. al.*, 1993; Engelen *et. al.*, 1994; Fiedler e Conrad, 1995).

Conrad e Fiedler (1994) demonstraram a facilidade de expressão intracelular de moléculas scFv funcionais em plantas para bloquear fatores de regulação, fitohormônios, metabólitos e introduzir proteção contra patógenos. Um scFv funcional foi expresso em planta reconhecendo proteínas importantes envolvidas na interação planta-nematóide, promovendo o scFv a candidato promissor para ser utilizado na resistência contra nematóides de galha de raiz (Rosso *et. al.*, 1996).

A expressão de anticorpos em plantas dirigidos contra proteínas essenciais para a patogênese de nematóides poderá fornecer uma alternativa para a engenharia de novas culturas resistentes. Com a construção da biblioteca de fragmentos de anticorpos scFv, este projeto se encontra em fase de identificar anticorpos de galinhas, gerados pela técnica de *phage display*, que sejam específicos as proteínas envolvidas no fitoparasitismo de nematóides, com grande importância econômica.

PERSPECTIVAS

Os anticorpos selecionados utilizando a biblioteca de anticorpos do tipo *phage display* serão introduzidos em vetor de expressão em plantas e testados quanto a sua eficiência de bloquear ou reduzir a infecção do nematóide *M. incognita* nas raízes das plantas. Estratégias que visem o retardamento ou o impedimento do estabelecimento do sítio de alimentação utilizando anticorpos funcionais, também chamados “plantibodies”, em plantas geneticamente

modificadas podem ser alternativas promissoras para reduzir a perda de culturas pelo ataque de fitonematóides.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARBAS III, C.F.; BURTON, D.R.; SCOTT, J.R.; SILVERMAN, G.J. **Phage Display: A laboratory manual**. Cold Spring Harbor laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 2001.

BIRD, D.M. Mechanisms of the *Meloidogyne*-host interaction, pp. 51-59. *In: Nematology: from Molecule to Ecosystem*. (eds. F. Gommers P.W.T. Maas). Dundee, UK: European Society of Nematologists, 1992.

CONRAD, U.; FIEDLER, U. Expression of engineered antibodies in plant cells. **Plant Molecular Biology**, v.26, p.1023-1030, 1994.

ENGELLEN, F.A.V.; SCHOUTEN, A.; MOLTHOFF, J.W.; STIEKEMA, W.J. Coordinate expression of antibody subunit genes yields high levels of functional antibodies in roots of transgenic tobacco. **Plant Molecular Biology**, v.26, p.1701-1710, 1994.

FIEDLER, U.; CONRAD, U. High-level production and long-term storage of engineered antibodies in transgenic tobacco seeds. **Biotechnology**, v.13, p. 1090-1093, 1995.

FIREK, S.; DRAPER, J.; OWEN, M.R.L.; GANDECHA, A.; COCKBURN, B.; WHITELAM, G.C. Secretion of a functional single-chain Fv protein in transgenic tobacco plants and cell suspension cultures. **Plant Molecular Biology**, v. 23, p. 861-870, 1993.

HUSSEY, R.S. & BARKER, A. A comparison methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. **Plant Disease Reporter**, v.57, p.1025-1028, 1973.

HUSSEY, R.S., DAVIS, E.L.; BAUM, T.J. Secrets in secretions: genes that control nematode parasitism of plants. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v.14, n.3, p. 183-194, 2002.

JUNG, C.; WYSS, U. New approaches to control plant nematodes. **Applied Microbiology Biothechnology**, v.51, p. 439-446, 1999.

ROSSO, M.N.; SCHOUTEN, A.; ROOSIEN, J.; VRENSSEN, T.B.; HUSSEY, R.S.; GOMMERS, F.J.; BAKKER, J.; SCHOTS, A. & ABAD, P. Expression and functional characterization of a single chain FV antibody directed against secretions involved in plant nematode infection process. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 220, p. 255-263, 1996.

SMANT, G.; STOKKERMANS, J.W.G.; YAN, Y.; DE BOER, J.M; BAUM, T.J.; WANGS, X.; HUSSEY, R.S.; GOMMERS, F.J.; HENRISSAT, B.; DAVIS, E.L.; HELDER, J.; SCHOTS, A. & BAKKER, A. Endogenous cellulases in animals: Isolation of b-1,4-endoglucanase genes from two species of plant-parasitic cyst nematodes (endoglucanase *Globodera Heterodera in situ* hybridization secretory protein). **Proceeding of the National. Academy of Sciences**, v.95, p. 4906–4911, 1998.

23 – EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS DE *Coffea canephora* INFECTADOS COM O NEMATÓIDE ENDOPARASITA *Meloidogyne* spp

Mehta, A.¹; Andrade, A.E. ²; Albuquerque, E.V.S. ¹; Carneiro, R.M.D.G. ¹, Carneiro, R.G.³ e Grossi de Sá, M. F. ¹

¹Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia; ² Faculdade da Terra de Brasília, ³ Instituto Agrônômico do Paraná.

RESUMO

Atualmente as pesquisas têm focado na caracterização funcional de proteínas codificadas por genes de resistência a diversos patógenos. Neste estudo, a expressão de proteínas durante a interação entre a planta de café resistente, *Coffea canephora* e o patógeno *Meloidogyne* spp foi realizada. Raízes de *C. canephora* foram infectadas com inóculos do nematóide na fase de juvenis (J2) com aproximadamente 10000 larvas por planta no total de 24 plantas. As raízes foram coletadas em um intervalo de tempo de 3, 6 e 10 dias após a infecção. Raízes não infectadas foram utilizadas como controle. As raízes foram lavadas com uma solução de água e hipoclorito de sódio a 10%; congeladas e armazenadas a -80°C. O material foi utilizado para extração de proteínas, que foram submetidas a eletroforese bidimensional (2-DE).

Os resultados obtidos através de 2-DE revelaram várias proteínas diferenciais nos diferentes tempos após a infecção quando os mapas foram comparados à condição controle. Na análise dos mapas de tempo 3, 5 proteínas diferenciais foram visualizadas. Enquanto que os mapas de tempo 6 e 10 revelaram 6 e 5 proteínas diferenciais, respectivamente. Essas proteínas deverão ser identificadas através de espectrometria de massa na tentativa de associá-las ao processo de resistência ao nematóide *Meloidogyne* spp, já que os mecanismos de defesa de plantas envolvem a expressão de proteínas específicas associadas ao reconhecimento do patógeno, ativando uma gama de outras proteínas responsáveis pela resistência.

INTRODUÇÃO

Os nematóides fitopatogênicos são parasitas obrigatórios que provocam danos econômicos de bilhões de dólares à agricultura mundial. Estes assumem importância destacada na cafeicultura, onde as perdas anuais são da ordem de US\$ 2,6 bilhões.

A identificação de genes do cafeeiro envolvidos com a resistência a *Meloidogyne* spp. é de vital importância para o combate e controle deste patógeno, podendo ser utilizados em estudos futuros visando à obtenção de plantas transgênicas resistentes.

Uma das estratégias para a identificação de genes de interesse é através de estudos de expressão, incluindo a análise de proteínas expressas em determinada condição. O estudo dessas proteínas através da eletroforese bidimensional (2-DE) de proteínas e espectrometria de massa tem sido utilizada em diferentes plantas como arroz, trigo, entre outras, e várias proteínas diferencialmente expressas têm sido identificadas.

O objetivo deste trabalho foi analisar a expressão global de proteínas de *C. canephora* (genótipo resistente a *Meloidogyne* spp.) em resposta à infecção por *Meloidogyne* spp., através de 2-DE e espectrometria de massa na tentativa de identificar proteínas/genes envolvidos com a resistência a este fitoparasita.

MATERIAL E MÉTODOS

Cultura de nematóides, extração de ovos e eclosão de juvenis

Meloidogyne spp. mantidos em tomateiros em casa de vegetação foram utilizados neste estudo. Para a obtenção dos nematóides, o sistema radicular dos tomateiros foi lavado com água corrente e as raízes foram trituradas no liquidificador com solução de 0,5% (v/v) de hipoclorito de sódio. O material resultante foi separado por um conjunto de peneiras de 100 a 400 mesh. Os ovos retidos na segunda peneira foram coletados e depois depositados

em papel toalha sobre uma peneira plástica dentro de um recipiente com água destilada. Espontaneamente, os ovos eclodiram em juvenis J2, que nadaram do papel toalha para o recipiente. Os juvenis foram então coletados por centrifugação a 2500 x g por 30 minutos e contados para a infestação de plantas de café.

Infestação das plantas e coletas das raízes infectadas

Cada planta de café foi infectada com aproximadamente 10000 larvas de *Meloidogyne* spp. após atingir 2 meses de idade. As coletas das raízes infectadas foram realizadas 3, 6 e 10 dias após a infecção e raízes não infectadas foram utilizadas como controle. Todas as raízes coletadas receberam o mesmo procedimento de limpeza e conservação – lavagem com água, congelamento em nitrogênio líquido e armazenamento a -80° C.

Extração de proteínas e eletroforese bidimensional

O material coletado foi utilizado para extração de proteínas totais de acordo com de Mot e Vanderleyden (1989). As proteínas foram posteriormente submetidas a eletroforese bidimensional para análise de proteínas diferencialmente expressas. SDS-PAGE foi realizado segundo Laemmli (1970) e os géis foram visualizados após coloração com nitrato de prata (Blum *et al.*, 1987).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com a análise dos mapas obtidos, através de 2-DE, foi possível observar um total de cerca de 200 proteínas por gel, que variaram em tamanho de 10 – 200 KDa e em *pI* de 4 – 8 (Fig. 1). A comparação desses mapas nos diferentes tempos após a infecção revelou várias proteínas diferencialmente expressas, incluindo *spots* novos, maior e menor intensidade.

Na análise dos mapas de tempo 3 (3 dias após a infecção), 7 proteínas diferenciais foram visualizadas (Fig. 1). Enquanto que os demais mapas de tempos 6 e 10 revelaram 6 e 4 proteínas diferenciais, respectivamente (Fig. 1). Um mapa de proteínas de larvas J2 de *Meloidogyne* spp. foi também construído a partir da extração de proteínas de aproximadamente 10.000 larvas (Fig. 2). As proteínas diferencialmente expressas em raízes de café não foram detectadas no mapa do nematóide, indicando que essas proteínas são de *C. canephora*. As proteínas diferenciais detectadas serão identificadas através de espectrometria de massa na tentativa de identificar proteínas/genes envolvidos com a resistência a *Meloidogyne* spp..

Espera-se que este trabalho contribua para a melhor compreensão dos mecanismos de defesa da planta em resposta a infecção por *Meloidogyne* spp.

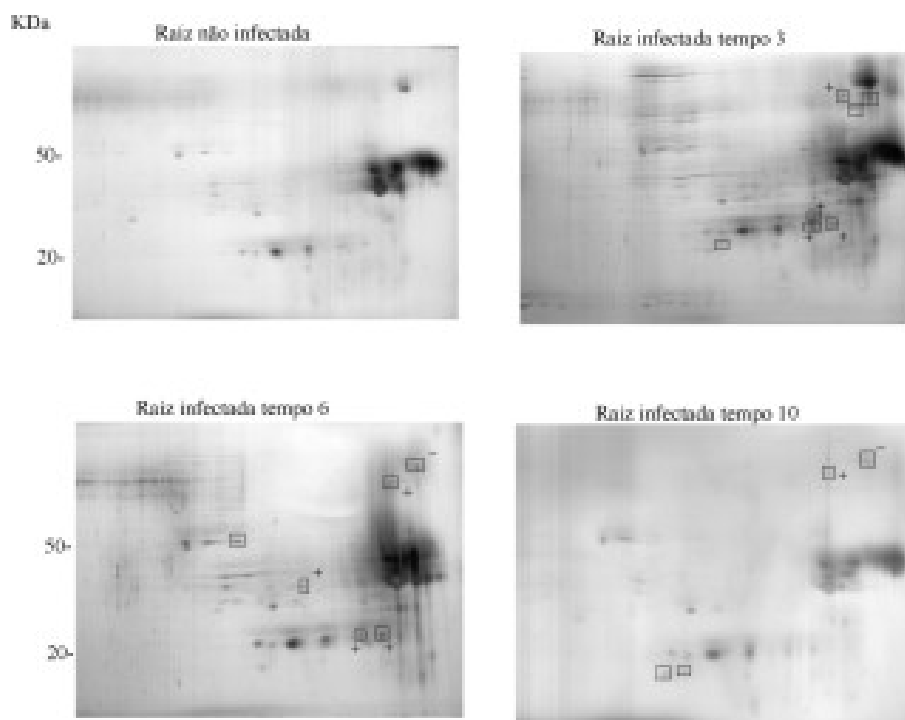


Figura 1. 2-DE de proteínas de raízes de café infectadas com *Meloidogyne* spp. e não infectadas, conforme indicado. Os sinais + e – indicam proteínas com maior e menor intensidade, respectivamente. Os quadrados sem símbolos indicam proteínas novas.

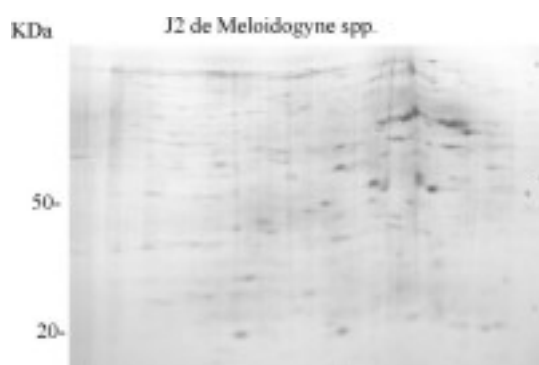


Figura 2. 2-DE de proteínas de *Meloidogyne* spp. na fase J2.

PERSPECTIVAS

No presente trabalho foram observadas várias proteínas de *C. canephora* expressas diferencialmente em diferentes tempos após a infecção com o nematóide *Meloidogyne* spp.. A identificação dessas proteínas através de espectrometria de massa poderá revelar proteínas importantes envolvidas no processo de resistência. A partir das proteínas, será possível identificar e isolar os genes responsáveis pela resistência, auxiliando assim os programas de melhoramento de café visando a obtenção de variedades resistentes a *Meloidogyne* spp.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant protein, RNA and DNA in polyacrilamide gels. **Electrophoresis**, v. 8, p. 93 – 98, 1987.
- DE MOT, R; VANDERLEYDEN, J. Application of two dimensional protein analysis for strain fingerprinting and mutant analysis of *Azospirillum* species. **Canadian Journal of Microbiology**, 1989, v. 35, p. 960 – 967, 1989
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680 – 685, 1970.

24 - EFEITOS DE EXTRATOS DE SEMENTES DE PLANTAS ANTAGONISTAS SOBRE A MORTALIDADE DE JUVENIS DE SEGUNDO ESTÁDIO DE *Meloidogyne incognita*.

Almeida, C.D.S.^{1,2}; Magalhães, J.C.C.¹; Franco, P.¹; Salomão, D.¹; Randig, O.¹; Carneiro, R.M.D.G.¹; Souza, D.S.L.^{1,2}; Grossi de Sá, M.F.¹ e Rocha, T.L.¹

¹Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF; ² Universidade de Brasília, Brasília, DF.

RESUMO

Os nematóides do gênero *Meloidogyne* spp causam grandes prejuízos a diversas culturas no mundo. Devido ao alto custo e toxicidade ao meio ambiente, os nematicidas vêm sendo substituídos por métodos alternativos de controle, como a rotação de culturas, cultivares resistentes e plantas antagonistas. Este estudo objetivou testar o efeito de extratos aquosos de sementes de feijão de porco (*Canavalia ensiformes*), crotalária (*C. juncea*, *C. paulinea* e *C. spectabilis*), cravo de defunto (*Tagetes minuta*) e mucuna preta (*Mucuna pruriens*) sobre juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita*, raça 3. Extratos aquosos foram obtidos a partir de 20g de sementes, que foram trituradas e mantidas em 500ml de água bi-destilada a 4°C durante 8h. O material foi coado em gase, filtrado em 0,45 micron e centrifugado. Os sobrenadantes foram recolhidos e apresentaram concentrações protéicas entre 0,6 e 15mg/mL, segundo o método de Bradford. Em SDS-PAGE, foram observadas proteínas cujos pesos moleculares variaram entre 3 e 200 kDa. Ovos de *M. incognita* foram extraídos de raízes de tomateiros infectados, com o uso de hipoclorito de sódio 0,5%. Os J₂ foram obtidos com a técnica de funil de Baemann modificado e a contagem foi processada em lâmina de Peters. Os ensaios foram realizados em placas de Petri, em triplicata, tendo como controle água bi-destilada. Foi misturado por placa um volume de 1ml contendo 500ug de extrato aquoso com uma suspensão de 1ml de água contendo 100 J₂ em um volume final de 5ml, completados com água bi-destilada. Em seguida, as placas foram transferidas para estufa e mantidas a uma temperatura de 26°C e, após 24hrs, os J₂ vivos e mortos foram contados com auxílio de um microscópio estereoscópico. As suspensões contendo J₂/extratos aquosos foram re-inoculados em plantas de tomate e após 3 meses, avaliou-se o número de galhas, ovos e o fator de reprodução, (população final/população inicial) por tratamento. Os resultados obtidos mostraram uma atividade nematicida sobre J₂ para todos os extratos analisados. Observou-se também uma redução significativa do número de galhas, ovos e do fator de reprodução para todos os tratamentos, quando comparados ao tratamento controle. Dentre as sementes das plantas estudadas, a que apresentou maior potencial nematicida foi a *C. ensiformes*, seguida por *C. spectabilis*. Os resultados gerados neste trabalho reforçam a necessidade do isolamento, identificação e purificação dos polipeptídeos/peptídeos ou fitocompostos que possam estar envolvidos no controle de *Meloidogyne* spp.

INTRODUÇÃO

Dentre os fitonematóides, o gênero *Meloidogyne*, por sua ampla disseminação e alta capacidade destrutiva, tem sido considerado um dos mais problemáticos na agricultura mundial (Dufour *et al.*, 2003; Amaral *et al.*, 2002; Opperman & Bird, 1998). As perdas anuais causadas por estes parasitas as culturas de algodão, café e cana de açúcar, alcançam cifras da ordem de US\$ 4,1 bilhões, US\$ 2,6 bilhões e US\$ 16,5 bilhões, respectivamente.

Diversas estratégias são utilizadas na tentativa de controlar o ataque de nematóides, como, por exemplo, a utilização de nematicidas, rotação de culturas, tratamento térmico, controle biológico e o uso de variedades resistentes, entre outras (Dufour *et al.*, 2003; Amaral *et al.*, 2002; Insunza *et al.*, 2001). Apesar das diversas possibilidades estratégicas, atualmente o controle de fitonematóides está centrado principalmente na rotação de culturas e no uso de nematicidas. No entanto, os nematicidas mais modernos nem sempre

apresentam um controle efetivo em relação ao custo do tratamento por hectare, considerando as grandes extensões a serem tratadas. Além disso, alguns nematicidas estão sendo removidos do mercado devido sua grande toxicidade à saúde humana ou, ainda, por serem detectados em níveis não aceitáveis nas águas de superfície e subterrâneas (Dufour *et al.*, 2003). A utilização da rotação de culturas e variedades resistentes também apresentam limitações, o que reforça a necessidade da busca de novas alternativas para um controle mais efetivo dos fitonematóides.

Trabalhos descritos na literatura sobre a ação de extratos de sementes, obtidos a partir de plantas antagonistas, demonstraram um efeito nematicida e nematostático bastante efetivos (Silva *et al.*, 2002). Tais efeitos têm sido freqüentemente relacionados à presença de metabólitos secundários, como taninos e fitoalexinas (Molan *et al.*, 2000). No entanto, o mecanismo de ação destas biomoléculas ainda é muito pouco conhecido. Adicionalmente, foi demonstrado que lectinas presentes em sementes geralmente estão associadas com o bloqueio do sistema quimiorreceptor dos nematóides, interferindo principalmente na sua motilidade e localização da planta (efeito nematostático) (Mendonza *et al.*, 1987). Para a realização deste estudo, foram selecionadas 6 espécies de plantas antagonistas: Feijão de porco, *C. juncea*, *C. paulinea*, *C. spectabilis*, Cravo de defunto e *Mucuna* preta. O isolamento e a caracterização de biomoléculas com potencial efeito nematicida ou nematostático, a partir de extratos de sementes dessas plantas, será de fundamental importância para o desenho de novas estratégias biotecnológicas visando o controle da meloidoginose.

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção dos extratos protéicos

Para a obtenção dos extratos aquosos, foram triturados 20g de sementes de feijão de porco (*Canavalia ensiformes*), Crotalária (*C. juncea*, *C. paulinea* e *C. spectabilis*), cravo de defunto (*Tagetes minuta*) e mucuna preta (*Mucuna pruriens*) para um volume final de 500ml. Os extratos foram mantidos em agitação lenta por 8 horas a 4°C. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 10.000rpm durante 30 minutos, e a concentração de proteínas dos sobrenadantes foi determinada pelo método de Bradford, (1976) utilizando-se BSA como padrão. O perfil protéico dos extratos foi determinado em gel de poliacrilamida SDS-PAGE (Laemmli, 1970).

Obtenção de nematóides

A extração dos ovos de *M. incognita* foi realizada utilizando-se raízes de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) infestadas. Essas raízes tiveram suas galhas seccionadas e trituradas em um liquidificador numa solução de hipoclorito de sódio 0,5% para a obtenção dos ovos, de acordo com a metodologia de Hussey & Barker (1973). Os ovos foram colocados em uma câmara de eclosão, dos quais foram selecionados 5000 J₂ com 48 horas. Os nematóides foram então dispostos em placas de Petri de 5cm de diâmetro na quantidade de 100 indivíduos por placa para a execução dos testes biológicos.

Testes in vitro para avaliação da atividade nematicida dos extratos vegetais

Para avaliar o efeito dos extratos de sementes sobre a mortalidade dos nematóides, foi utilizado 1ml de cada extrato para um volume final de 5 ml por placa de Petri. Os bioensaios foram mantidos a 26°C e após 24h os J₂ mortos e vivos foram contados com o auxílio de microscópio estereoscópico. Todos os testes foram realizados em triplicata, tendo como controle negativo a água. Os indivíduos tidos como mortos e vivos após todos os bioensaios também foram re-inoculados em plantas de tomateiro (*L. esculentum*), e depois de três meses foi feita a contagem de ovos e galhas e o coeficiente de reprodução (Cr) foi calculado obedecendo a seguinte equação ($Cr = \text{População final} / \text{População inicial}$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação a separação dos extratos via eletroforese unidirecional utilizando gel linear de poliacrilamida desnaturante (12%), foram observadas bandas de pesos moleculares variando de 3 a 200 kDa, aproximadamente, em todas as amostras analisadas. Além disso, foram constatadas também diferenças significativas nos perfis eletroforéticos destas amostras (figura 1).

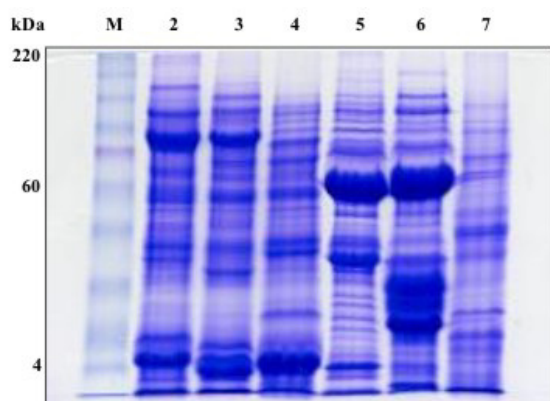


Figura 1 - Gel linear desnaturante de poliacrilamida (12%)

M - marcador de peso molecular

2 - *Crotalaria juncea*

3 - *Crotalaria spectabilis*

4 - *Crotalaria paulinea*

5 - Feijão de porco

6 - *Mucuna preta*

7 - Cravo de defunto

* Foi aplicado 30 µg de proteína em cada poço do gel.

Os resultados obtidos nos bioensaios mostraram uma atividade nematocida sobre J_2 para todos os extratos analisados. Dentre as plantas estudadas, a que provocou a maior taxa de mortalidade sobre os nematóides foi a *C. ensiformes*, seguida por *C. spectabilis* (figura 2).

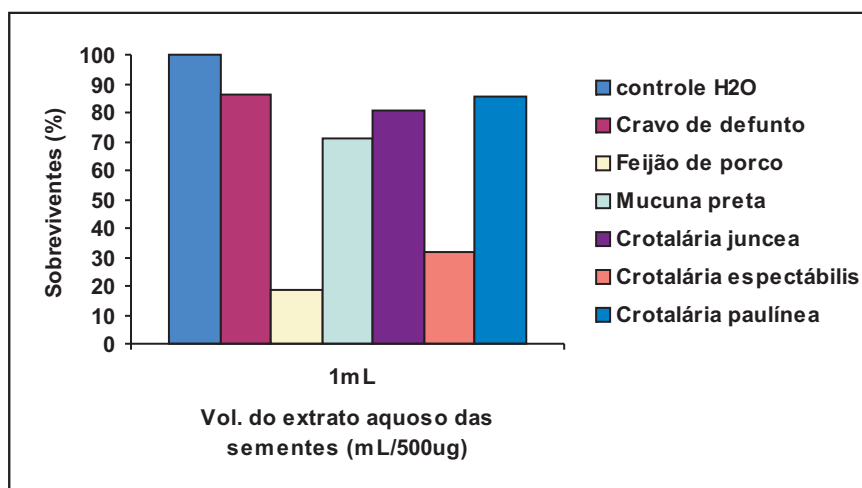


Figura 2 - Análise do efeito nematocida de extratos aquosos de sementes de plantas antagonistas contra J_2 de *Meloidogyne incognita* raça 3

Para validar o experimento acima, os extratos das plantas utilizados nos ensaios (extrato + J₂) foram re-inoculados em plantas de tomate (*L. esculentum*). Após três meses, foi verificado que, quando comparadas ao controle, as plantas apresentavam um menor número de galhas e, portanto, menor fator de reprodução.

Estes resultados estão de acordo com dados disponíveis na literatura, sugerindo a presença de peptídeos e/ou fitocompostos com ação nematicida. Extratos de várias plantas encontradas na natureza possuem efeito nematostático e/ou nematicida (Silva *et al.*, 2002). As lectinas encontradas em sementes, por exemplo, interferem na motilidade dos nematóides por bloquearem seu sistema quimiorreceptor. Além disso, metabólitos secundários, como taninos e fitoalexinas, também possuem atividade nematicida e nematostática sobre fitonematóides (Molan *et al.*, 2000). Entretanto, apesar do vasto número de trabalhos existentes nesta área, pouco se sabe a respeito do mecanismo de ação destas moléculas bioativas. Assim sendo, informações acerca da natureza bioquímica e estrutural das biomoléculas com atividade nematicida e/ou nematostática permitirão não somente o entendimento dos seus mecanismos efetivos contra os fitoparasitas, mas também identificar como e em que fase do desenvolvimento do nematóide elas atuam.

PERSPECTIVAS

Os resultados gerados neste trabalho reforçam a necessidade do isolamento e caracterização de biomoléculas com potencial efeito nematicida ou nematostático, a partir de extratos de sementes dessas plantas. Este trabalho será de fundamental importância para o desenho de novas estratégias biotecnológicas visando o controle da meloidoginose.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARAL, D.R.; OLIVEIRA, D.F.; CAMPOS, V.P.; CARVALHO, D.A. Efeitos de alguns extratos vegetais na eclosão, mobilidade, mortalidade e patogenicidade de *Meloidogyne exigua* do cafeeiro. **Nematologia Brasileira**, v. 26, n.1, p.: 43-48, 2002.
- DUFOUR, R., GUERRERA M., EARLES, R. 2003. Appropriate Technology Transfer for Rural Areas. **Alternative Nematode Control**, Disponível em: www.attra.ncat.org. Acessado em: 14 de junho de 2004.
- INSUNZA, V., ABALLAY, E., MACAYA, J. 2001. Nematicidal Activity of Aqueous Plant Extract on *Xiphinema index*. **Nematologia Mediterranea**, 29: 35-40.
- MARBAN-MENDONZA, N., JEYAPRAKASH, A., JANSON, H.B., DAMON, Jr, R.A. & ZUCKERMAN, B.M. 1987. Control of root-knot nematodes on tomato by lectins. **Journal of Nematology**, 19: 331-335.
- MOLAN, A.L., ALEXANDER, R., BROOKAS, I.M., & MCNABB, W.C. 2000. Effects of sulla condensed tannins on the viability of three sheep gastrointestinal nematodes. **NZSAP**, 60: 21-25
- LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227:680-687.
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein - dye binding. **Analytical biochemistry**, 72, 248-254.
- HUSSEY, R.S. & BARKER, A. A. 1973. Comparison methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. **Plant Disease Reporter**, v.57, p.1025-1028.
- OPPERMAN, C.H.; BIRD, D.M. The soybean cyst nematode, *Heterodera glycines*: a genetic model system for the plant-parasitic nematodes. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v. 1, p. 342-346, 1998.

25 – INVESTIGAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS EXISTENTES NO EXTRATO AQUOSO DE SEMENTES DE *CANAVALIA ENSIFORMES* (FEIJÃO DE PORCO) COM EFEITO NEMATICIDA SOBRE JUVENIS DE SEGUNDO ESTÁDIO DE *MELOIDOGYNE INCOGNITA* RAÇA 3

Evaristo, R. G. S^{1,3}., Magalhães, J.C.C¹., Franco, P¹., Randig, O¹., Carneiro, R.M.D.G¹., Souza, D.S.L^{1,2}., De Sá, F.G¹., Rocha, T.L¹.

¹EMBRAPA – Recursos Genéticos e Biotecnologia, ²UNB – Universidade de Brasília ³FTB – Faculdade da Terra de Brasília

RESUMO

Extratos de sementes de várias espécies de plantas, como crotalárias (*Crotalaria juncea*, *paulinea* e *spectabilis*), cravo de defunto (*Tagetes minuta*), mucuna preta (*Mucuna pruriens*) e feijão de porco (*Canavalia ensiformes*), já foram bem caracterizados em vários trabalhos, como fontes de moléculas com ação anti-nematóide. Entretanto, pouco se sabe a respeito da natureza e dos mecanismos de ação destas moléculas bioativas sobre estes parasitas. O isolamento e a caracterização dos compostos presentes nas sementes permitirá o desenho de novas estratégias biotecnológicas a serem utilizadas no controle dos fitonematóides. Sendo assim, o objetivo deste trabalho é identificar e caracterizar estas moléculas presentes em sementes de feijão de porco. Para tanto, 10g de sementes foram trituradas e homogeneizadas em 60ml de água. Em seguida, o material foi centrifugado e o sobrenadante filtrado, quantificado, alíquotado e estocado a -20°C. Para determinar o efeito desse extrato sobre os nematóides (J₂ preparasitas), foram utilizadas duas metodologias de separação: a diálise e a cromatografia de exclusão molecular. Os materiais obtidos após a diálise (dialisado interno e dialisado externo) e os picos provenientes da cromatografia foram utilizados em bioensaios para avaliar seu efeito nematicida e/ou nematostático contra J₂. Os resultados obtidos revelaram um efeito nematicida do dialisado externo e um efeito nematostático do pico 6 da cromatografia de exclusão molecular contra os nematóides. Estes resultados indicam que o efeito tóxico e nematostático proveniente das frações analisadas se deu pela ação de moléculas de baixo peso molecular, como fitocompostos, peptídeos ou proteínas com ação sobre a cutícula do J₂, já que o nematóide não se alimenta nesta fase de desenvolvimento.

INTRODUÇÃO

A meloidoginose é a patogenia resultante da interação nematóide-vegetal que induz a diferenciação de focos celulares, provocando a formação de galhas radiculares que reduzem severamente a produtividade e, em casos mais graves, podem levar à morte da planta (Dufour *et al.*, 2003). Dentre os fitonematóides, os do gênero *Meloidogyne* possuem uma ampla disseminação e um alto poder de destruição, representando um grave problema às agriculturas brasileira e mundial (Dufour *et al.*, 2003; Amaral *et al.*, 2002). As perdas anuais provocadas por *Meloidogyne spp.* a culturas como algodão, café e cana-de-açúcar atingem patamares de US\$ 4,1 bilhões, US\$ 2,6 bilhões e US\$ 16,5 bilhões, respectivamente.

Algumas metodologias já foram descritas para o controle desses parasitas, como, por exemplo, o uso de nematicidas, a rotação de culturas, o uso de variedades resistentes, a utilização de plantas antagonistas e o controle biológico, entre outras (Dufour *et al.*, 2003; Amaral *et al.*, 2002; Insunza *et al.*, 2001; Ferraz & Freitas, 2000; Walla *et al.*, 1999). A aplicação de nematicidas é a metodologia mais utilizada contra esses parasitas, mas sua utilização está sendo reduzida devido à elevada toxicidade de seus compostos aos seres humanos e à alta taxa de contaminação da água dos rios e dos lençóis freáticos (Dufour *et al.*, 2003; Ferraz & Freitas, 2000).

Efeitos nematicidas de extratos de sementes já foram demonstrados para um grande número de plantas (Khurma, U.R. & Singh, A, 1997). Resultados parciais deste trabalho

demonstraram que os extratos aquosos de sementes das plantas já citadas, mais os extratos de *Stizolobium aterrimum*, apresentaram atividade nematicida contra juvenis de segundo estágio (J_2) de *Meloidogyne incognita* raça 3.

Dentre as plantas analisadas, a que provocou maior índice de mortalidade, além de efeito nematostático, foi *Canavalia ensiformes*. Suas sementes são ricas em lectinas, que constituem cerca de 2-3% de sua massa total (Alvarez, 1989). As lectinas têm sido freqüentemente associadas ao bloqueio do sistema quimiorreceptor dos nematóides, interferindo principalmente na sua motilidade e na capacidade de localizar a planta (Chitwood, 1949; Mendonza *et al.*, 1987). Por outro lado, o efeito nematicida provocado por uma das frações analisadas (dialisado externo), pode estar relacionado com a presença de metabólitos secundários (fitocompostos) nas sementes. Portanto, a próxima etapa deste trabalho consiste em purificar e caracterizar os biocompostos que apresentaram atividade nematicida e/ou nematostática, a fim de que possamos delinear uma estratégia específica e mais eficiente para o controle dos fitonematóides.

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção dos Extratos Vegetais:

As sementes de *C. ensiformes* foram cedidas pela EMBRAPA Sede. Dez gramas deste material foram pesados e moídos em um triturador elétrico Turrax. Em seguida, o pó resultante foi homogeneizado em 60ml de dH_2O e mantido sob leve agitação durante 24 horas em câmara fria. Após esta etapa, o material foi coado em gaze e centrifugado a 10.000rpm durante 45 minutos a 4°C. O pellet foi descartado e o sobrenadante (extrato cru) filtrado em membrana com poro de 0,45 μ m. Esse extrato foi quantificado, utilizando-se a metodologia de Bradford (1976), aliquotado em tubos Falcon de 50ml e estocado em freezer a -80°C.

Técnicas de Separação de Proteínas e Fitocompostos:

Diálise

Uma alíquota de 10ml do extrato cru aquoso de *C. ensiformes* foi dialisada contra 200ml de dH_2O durante 24 horas em membranas de diálise com poros de 3,5 kDa. O volume do material retido no interior do saco de diálise (dialisado interno) foi de 13ml, sendo estocado em um tubo Falcon de 50ml e estocado em freezer a -80°C. O material que atravessou a membrana de diálise (dialisado externo) ficou imerso num volume de 200ml de dH_2O e também foi estocado em tubos Falcon de 50ml, sendo em seguida encaminhado para a liofilização.

Cromatografia de exclusão molecular

Uma alíquota de 2ml do extrato cru aquoso, contendo 12 mg de proteínas, foi aplicada no topo de uma coluna de exclusão molecular (90cm x 1,5 cm) Sephacryl S200, pré-equilibrada com água destilada. Frações de 3ml por tubo foram coletadas em um fluxo de 0,2mL/minuto. O perfil de eluição protéica foi determinado em espectrofotômetro (Biophotometer-Eppendorf) a 280nm (figura 1). Os picos obtidos foram quantificados também usando a metodologia de Bradford (1976). As frações foram agrupadas segundo os picos obtidos no cromatograma e armazenadas a -80°C.

*Obtenção de J_2 de *M. incognita*, raça 3:*

A extração dos ovos de *M. incognita* foi realizada utilizando-se raízes de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) infestadas por um período de 3 meses. Essas raízes tiveram suas galhas seccionadas e trituradas em um liquidificador numa solução de hipoclorito de

sódio 0,5% para a obtenção dos ovos, de acordo com a metodologia de Hussey & Barker (1973). Os ovos foram colocados em uma câmara de eclosão, dos quais foram selecionados 5000 J₂ com 48 horas. Esses J₂ foram dispostos em placas de Petri de 5cm de diâmetro na quantidade de 100 nematóides por placa para a execução dos testes biológicos.

Testes de atividade nematicida ou nematostática contra J₂ de M. incognita:

Os testes biológicos contra os J₂ de *M. incognita* foram realizados com todas as amostras obtidas. Para os bioensaios foram utilizadas alíquotas do extrato cru aquoso, dos dialisados interno e externo e dos picos obtidos na cromatografia de exclusão molecular. Um volume de 83ml do extrato cru aquoso, contendo 500mg de proteínas, foi aplicado na placa de Petri contendo 100 nematóides para um volume final de 5ml. Os dialisados interno e externo foram ressuspensos no menor volume possível (2ml) e então diluídos para ficar com a mesma concentração do extrato cru aquoso. Para os picos cromatográficos, um volume de 4ml das amostras, contendo também 500mg cada, foram aplicados nas placas com os nematóides. As placas foram deixadas a 26°C durante dois dias. Ao término desse período, foi feita a contagem dos J₂ vivos em cada placa, com auxílio de um microscópio estereoscópico. Controles com água destilada e BSA, na mesma concentração descrita para as amostras, foram utilizados nos experimentos. Todos os testes foram feitos em duplicata.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para determinar o efeito do extrato de semente de *C. ensiformes* sobre os nematóides (J₂ parasitas), foram aplicadas duas metodologias de separação: cromatografia de exclusão molecular e a diálise.

Um cromatograma contendo seis picos protéicos foi obtido a partir da análise cromatográfica (figura 1). As frações referentes a cada um dos picos foram reunidas e quantificadas para serem analisadas quanto ao seu efeito nematicida ou nematostático em bioensaios contra J₂ de *M. incognita*.

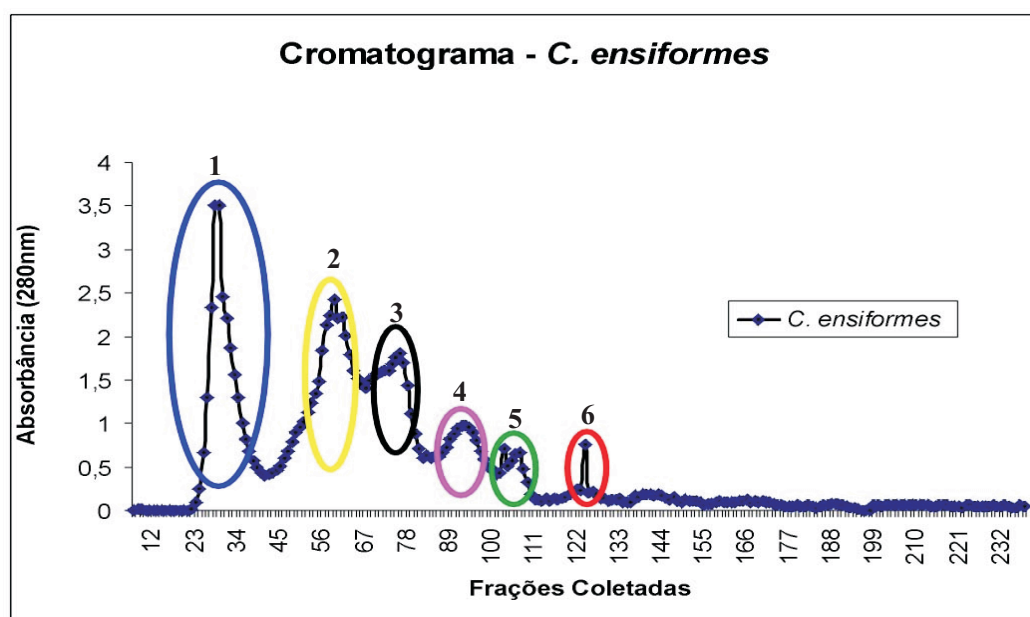


Figura 1: Perfil cromatográfico de 12 mg de extrato aquoso de semente de *C. ensiformes* usando Sephacryl S200. As proteínas foram separadas em 06 picos obedecendo um fluxo de 0.2mL/min e coleta de frações de 3mL/tubo. As proteínas foram eluídas com água destilada.

Os resultados dos ensaios biológicos revelaram um efeito nematicida para o dialisado externo, com 95% dos J_2 mortos. Paralelamente, foi observado um efeito nematostático acentuado do pico 6 da cromatografia de exclusão molecular, com 86% dos J_2 em estado completo de letargia (figura 2). Para o controle negativo (com água destilada) e o controle protéico (com BSA), não foi observado nenhum tipo de efeito, ficando os J_2 vivos e lépidos após o período de 48 horas. Em contrapartida, para o controle positivo utilizando extrato cru aquoso, foi constatado um efeito nematicida com morte de praticamente todos os J_2 utilizados no ensaio (figura 2).

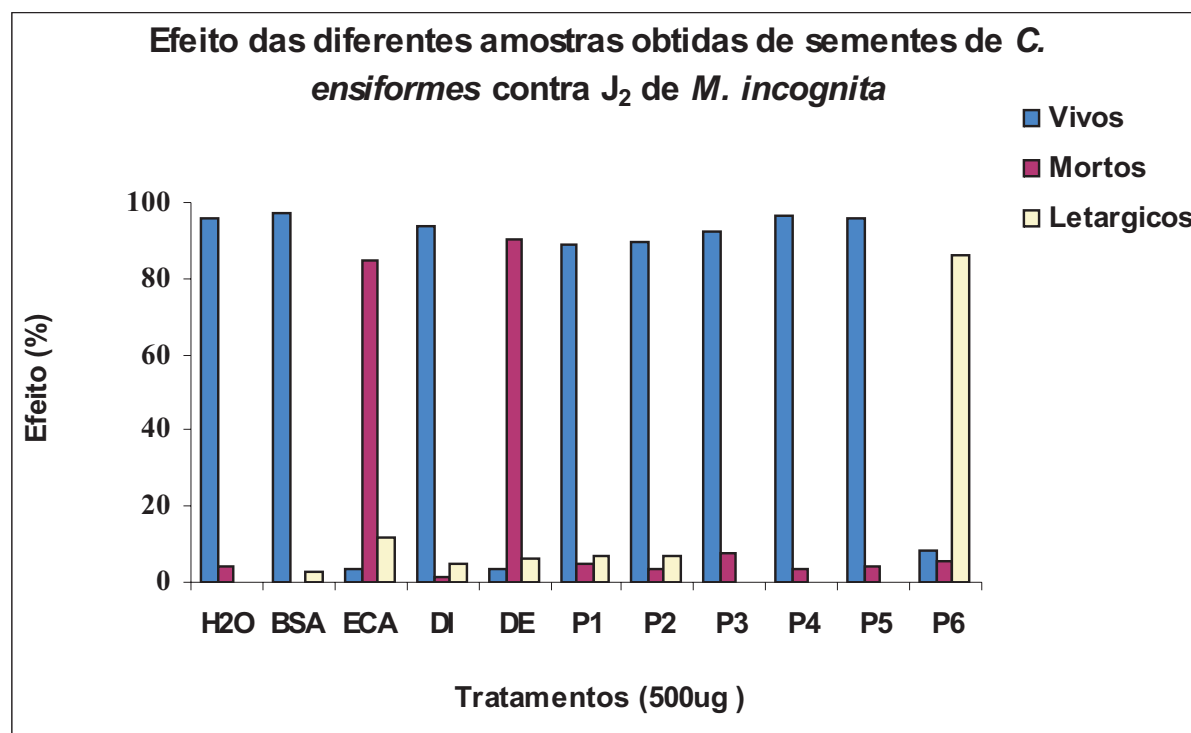


Figura 2: Bioensaios para avaliar a atividade nematicida ou nematostática das amostras provenientes da cromatografia de exclusão molecular e da diálise, onde P1-P6 correspondem aos picos cromatográficos e ECA, DI e DE, correspondem ao extrato cru aquoso, dialisado interno e dialisado externo, respectivamente. BSA e H2O correspondem aos controles.

Estes resultados sugerem que o efeito tóxico do dialisado externo sobre os nematóides pode ser resultante da ação de fitocompostos ou peptídeos (< 3.5 kDa) ou ainda da ação de lectinas presentes nas sementes de *C. ensiformes*. As lectinas têm sido frequentemente associadas ao bloqueio do sistema quimiorreceptor dos nematóides, interferindo principalmente na sua motilidade e sua capacidade de localizar a planta (Mendonza *et al.*, 1987). Adicionalmente, as lectinas constituem cerca de 2-3% da massa total de proteínas nas sementes de *C. ensiformes* (Alvarez, 1989).

PERSPECTIVAS

Informações acerca da natureza bioquímica e estrutural das biomoléculas com atividade nematicida e/ou nematostática, obtidas do extrato de semente vegetal de *C. ensiformes*, permitirão não somente o entendimento dos mecanismos efetivos destas biomoléculas contra os parasitas, mas também observar como e em que fase do desenvolvimento do nematóide elas atuam. Portanto, a próxima etapa deste trabalho consiste em purificar e caracterizar estes biocompostos para que possamos delinear uma estratégia específica e mais eficiente para o controle dos fitonematóides.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DUFOUR, R., GUERRERA M., EARLES, R. 2003. Appropriate Technology Transfer for Rural Areas. Alternative Nematode Control, Disponível em: www.attra.ncat.org. Acessado em: 14 de junho de 2004.
- AMARAL, D. R., OLIVEIRA, D. F., CAMPOS, V. P., CARVALHO, D. A. 2002. Efeito de Alguns Extratos Vegetais na Eclosão, Mobilidade, Mortalidade e Patogenicidade de *Meloidogyne exigua* do Cafeeiro. **Nematologia Brasileira**. 26 (1): 43-48.
- ALVAREZ, N.G. La rotacion con leguminosas como alternative para reducir el dano causado por fitopatogenos Del suelo y elevar la productividad Del agro ecosistema maiz em el tropico humedo. (Tese de Mestrado). Montecillo. Mexico, Colegio Posgraduados ,1989.
- MARBAN-MENDONZA, N., JEYAPRAKASH, A., JANSON, H.B., DAMON, JR, R.A. & ZUCKERMAN, B.M. Control of root-knot nematodes on tomato by lectins. **Journal of Nematology** 19: 331-335. 1987.
- HUSSEY, R.S. & BARKER, A. A. Comparison methods of colleting inocula of *Meloidogyne* spp. incluínd a new technique. Plant Disease Reporter, v.57, p.1025-1028, 1973.
- INSUNZA, V., ABALLAY, E., MACAYA, J. 2001. Nematicidal Activity of Aqueous Plant Extract on *Xiphinema index*. **Nematologia Mediterranea** 29: 35-40.
- FERRAZ, S., FREITAS, L. G. 2000. Sociedade Brasileira de Nematologia. O Controle de Fitonematóides por Plantas Antagonistas e Produtos Naturais. Disponível em: www.ciagri.usp.br/~sbn. Acessado em: 14 de junho de 2004.
- KHURMA, R & SINGH, A. 1997. Nematicidal potential of seed extracts: In vitro effects on juvenile mortality and egg hatch of *Meloidogyne incognita* and *M. javanica*. **Nematologia Mediterranea** 25: 49-54.
- WALLA, R. K., NANDAL, S. N., BHATTI, D.S. 1999. Nematicidal Efficacy of Plant Leaves and *Paecilomyces lilacinus*, Alone or In Combination, in Controlling *Meloidogyne incognita* on Okra and Tomato. **Nematologia mediterranea** 27: 3-8.
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of micogram quantities of protein utilizing the principle of protein - dye binding. **Analytical Biochemistry**. 72, 248-254.

26 – APLICAÇÃO DAS TÉCNICAS DE CULTIVO DE TECIDOS NA TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DO ALGODOEIRO

Vidal, M.S.¹; Carvalho, J.M.F.¹; Santos, J.W.¹; Lima, L.H.G.M.²; Sousa, E.B.M.² e Sousa, D.M.M.²

¹Embrapa Algodão, Campina Grande, PB; ² Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, PB.

RESUMO

A cultura do algodoeiro herbáceo apresenta relevante importância econômico-social no Brasil e no mundo, situando-se entre as dez maiores fontes de riqueza no setor agropecuário brasileiro. Do algodoeiro quase tudo é aproveitado, destacando-se a semente e a fibra, principal produto do algodão. Objetivou-se, com este trabalho, estabelecer um meio adequado de superbrotamento em cultivo de tecidos em algodão (*Gossypium hirsutum* L.) Sementes selecionadas das cultivares CNPA ITA-90II e BRS JATOBÁ foram lavadas e desinfestadas com solução de hipoclorito de sódio a 1% de cloro ativo e, em seguida, enxaguadas três vezes com água deionizada estéril e, posteriormente, cultivadas em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio MS, suplementados com 30 g.L⁻¹ de sacarose, 6,5 g.L⁻¹ de ágar e pH ajustado para 5,8, vedados com fita-filme. Esses tubos foram mantidos no escuro pelo período de 48-72 horas e, depois, durante 20-25 dias, a um fotoperíodo de 16h de luz/8h de escuro, para desenvolvimento da plântula. Dessas plântulas foram extraídos os ápice caulinares, que foram subcultivados em frascos contendo meio MS suplementado com diferentes combinações dos hormônios 6-Benzilaminopurina - BAP (0,0; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 mg.L⁻¹) e cinetina - CIN (0,0; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 mg.L⁻¹), sendo numerados de MB0 (livre de hormônio - testemunha) a MB25, cada meio com cinco frascos contendo três explantes cada um. Os frascos foram mantidos, durante 45 dias, sob as mesmas condições às quais os tubos foram submetidos e então se observou o número de brotos por explante. Os dados foram analisados mediante o procedimento "General Linear Model (GLM)" do SAS, destacando-se o meio MB 7 suplementado com as combinações 1,5 mg.L⁻¹ de BAP + 1,5 mg.L⁻¹ de CIN para a cultivar JATOBÁ, enquanto a cultivar respondeu melhor à indução de múltiplos brotos quando em meio MB21 (MS + 1,0 mg.L⁻¹ de BAP + 3,0 mg.L⁻¹ de CIN).

INTRODUÇÃO

Estudos cada vez mais avançados com a cultura algodoeira visam desenvolver técnicas que possam auxiliar os programas de melhoramento desta cultura, não obstante a sua substituição mas, sim, complementá-las (Gyves, 1994).

Com o emprego da biotecnologia alguns problemas relacionados ao melhoramento genético do algodoeiro podem ser resolvidos a curto e médio prazo, podendo encurtar o ciclo do melhoramento (Carvalho *et al.*, 1999).

A cultura de tecidos é uma das técnicas biotecnológicas que vem sendo utilizada como ferramenta para encurtar os programas de melhoramento genético de plantas. Dentro da cultura de tecidos uma das metodologias empregadas é o superbrotamento, que consiste em, a partir de um único explante cultivado nas condições ideais, acima citadas, possam ser geradas várias plantas geneticamente idênticas às do exemplar original e em menor espaço de tempo.

Da mesma forma que a engenharia genética vegetal está amplamente baseada no cultivo de tecidos, os processos de transformação genética vegetal também, uma vez que a transformação requer que se possa cultivar *in vitro* protoplastos, células e tecidos de plantas que se vão transformar e que, com as células transformadas, se possa regenerar plantas; além disso, a frequência de transformação pode ser aumentada através da indução de organogênese na região do meristema apical, isto é, através da indução de uma multibrotação (Aragão *et al.*, 1998).

Diferentes técnicas de transformação genética de plantas foram estabelecidas com o desenvolvimento da cultura de tecidos e da engenharia genética (Brasileiro e Carneiro, 1998). Para o algodoeiro, a transformação genética é obtida basicamente através de duas metodologias: bombardeamento de micropartículas (McCabe e Martinell, 1993) e cocultivo com *Agrobacterium tumefaciens* (Firrozabady *et al.*, 1987; Umbeck *et al.*, 1987), extremamente dependentes da cultura de tecidos; ambas produzem plantas transgênicas, com diferentes graus de eficiência, uma vez que a regeneração de plântulas, dependendo do explante empregado e do genótipo, é muito baixa. Por este motivo muitos grupos fazem opção por introduzir genes provenientes de outros organismos diretamente em cultivares elites de algodoeiro, como linhagens Coker (Trolinder e Xhixian, 1989; Firrozadady e De Boer, 1993; Koonce *et al.*, 1996). Uma das dificuldades desta estratégia é o intervalo de tempo relativamente longo para transferir a característica transgênica para as variedades comerciais, geralmente 6 a 10 gerações de cruzamento; deste modo, o desenvolvimento de metodologia de morfogênese, organogênese ou embriogênese somática, adaptadas às cultivares desenvolvidas pela Embrapa Algodão, possibilitarão um incremento, tanto em aspectos qualitativos como quantitativos da cultura algodoeira.

Objetivou-se, através deste trabalho, estabelecer um meio adequado de superbrotamento em cultivo de tecidos em algodão para as cultivares CNPA ITA-II e BRS JATOBÁ.

MATERIAL E MÉTODOS

As sementes selecionadas das cultivares CNPA ITA-II e BRS JATOBÁ foram lavadas e desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio a 1% de cloro ativo. Em seguida, foram enxaguadas três vezes com água deionizada estéril e, posteriormente, cultivadas em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio MS (Murashige e Skoog, 1962), suplementados com 3% de sacarose, 0,65% de ágar e pH ajustado para 5,8. Os tubos contendo as sementes foram mantidos no escuro por um período de 48–72 horas e, depois, transferidos para um fotoperíodo de 16h de luz/8h de escuro, onde foram mantidos por quinze dias, para desenvolvimento da plântula-matriz. Dessas plântulas foram extraídos os meristemas apicais, que foram subcultivados em frascos contendo meio MS básico suplementado com diferentes combinações dos hormônios 6-Benzilaminopurina (BAP) (0,0; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 mg.L⁻¹) e cinetina (Kin) (0,0; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 mg.L⁻¹) e numerados de MB0 (livre de hormônio) a MB25, com cinco repetições contendo três explantes por frasco. Utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado. Os frascos foram mantidos durante sete semanas sob as mesmas condições às quais as plântulas-matriz foram submetidas e, então, foi observado o número de brotos por explante.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O emprego de ápice caulinar como explante para superbrotamento foi muito eficaz, já que o mesmo apresenta-se em estágio embrionário com alto poder de diferenciação, gerando partes novas na planta. Uma vez isolado e colocado num meio de cultura contendo nutrientes e diferentes concentrações das citocininas (BAP e CIN) foi verificado o desenvolvimento de vários brotos a partir de um único explante tanto para a cultivar CNPA ITA-II quanto para a BRS JATOBÁ.

Dos 26 meios de cultura trabalhados com o explante ápice caulinar para a indução e o desenvolvimento de maior número de brotos, foi verificado que o nomeado MB 7 foi o que melhor respondeu para a cultivar de algodão BRS JATOBÁ, ao passo que para a cultivar CNPA ITA-II que gerou melhor resposta foi o MB 21 (Tabela 1).

No trabalho realizado por Carvalho e colaboradores (2000) sobre indução de superbrotamento e regeneração de planta *in vitro* na cultivar de algodão CNPA 7H, utilizando o nó cotiledonar como explante, o meio que produziu um maior número de brotos foi o

suplementado com 2,5 mg.L⁻¹ de BAP e CIN. O efeito da resposta do número de brotos da combinação das duas citocininas na mesma concentração desta cultivar foi bastante semelhante ao presente estudo, pois além de serem iguais às concentrações, apenas necessitou de quantidade maior.

Tabela 1. Valores médios de tratamento referentes à variável do número de brotos, dos 26 tratamentos com citocininas, nas cultivares de algodão CNPA ITA-II e BRS JATOBÁ.

Meio	Citocininas (mg.L ⁻¹)		Média ¹	
	KIN	BAP	CNPA ITA -90II	BRS JATOBÁ
MB0	0,0	0,0	1,249 d	1,303 f
MB1	1,0	1,0	2,278 abc	1,947 abcde
MB2	1,0	1,5	2,274 abc	1,631 bcdef
MB3	1,0	2,0	2,372 abc	2,073 abcde
MB4	1,0	2,5	1,940 bc	1,563 def
MB5	1,0	3,0	1,897 bcd	2,045 abcde
MB6	1,5	1,0	2,101 abc	2,184 abc
MB7	1,5	1,5	1,970 abc	2,332 a
MB8	1,5	2,0	2,039 abc	2,219 ab
MB9	1,5	2,5	2,066 abc	2,059 abcde
MB10	1,5	3,0	1,960 bc	2,018 abcde
MB11	2,0	1,0	2,325 abc	1,705 abcdef
MB12	2,0	1,5	2,106 abc	1,897 abcdef
MB13	2,0	2,0	1,926 bc	2,079 abcde
MB14	2,0	2,5	1,736 cd	2,128 abcd
MB15	2,0	3,0	2,081 abc	1,869 abcdef
MB16	2,5	1,0	2,064 abc	2,081 abcde
MB17	2,5	1,5	2,341 abc	1,482 ef
MB18	2,5	2,0	1,972 abc	1,563 cdef
MB19	2,5	2,5	2,233 abc	1,949 abcde
MB20	2,5	3,0	2,235 abc	1,840 abcdef
MB21	3,0	1,0	2,672 a	2,043 abcde
MB22	3,0	1,5	2,208 abc	1,777 abcdef
MB23	3,0	2,0	2,090 abc	1,730 abcdef
MB24	3,0	2,5	2,456 ab	1,855 abcdef
MB25	3,0	3,0	2,223 abc	1,791 abcdef
CV% ²			24,852	24,932

1Dados transformados em $y = \sqrt{x + 1}$

2Coeficiente de variação

Médias seguidas pelas mesmas letras, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

PERSPECTIVAS

Com o desenvolvimento de meios de cultivo específicos para a indução de superbrota em cultivares de algodão desenvolvidas pela Embrapa Algodão e que estejam sendo comercializadas, espera-se empregá-los em programas de transformação genética desta cultura, de modo que a frequência de transformação seja aumentada. Esta metodologia deverá ser empregada para o desenvolvimento de novas cultivares com características de importância agrônômica, as quais não puderam ser melhoradas pelo

sistema convencional como, por exemplo, a obtenção de plantas resistentes ao bicudo, plantas que apresentem fibras coloridas (azul, preto etc), plantas resistentes à seca etc.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAGÃO, F.J.L.; VIANNA, G.R.; RECH, E.L. **Feijão transgênico**. Bio-tecnologia Ciência & Desenvolvimento. Brasília, V.1. 49p., 1998.
- BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T.C. Introdução à transformação genética de plantas. In: BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T.C., ed. **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/Embrapa-Cenargen, p.13-33, 1998.
- CARVALHO, J. M. F. C., MOREIRA, J. de A. N., VIEIRA, R. de M. Cultivo *in vitro* do algodão. In: BELTRÃO, N. E. de M. **O agronegócio do algodão no Brasil**. v. 1, Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, p. 405- 418, 1999.
- CARVALHO, J. M. F. C., SOUZA, D. M. de, SANTOS, J. W. dos. **Indução de superbrotamento e regeneração de planta *in vitro* na cultivar de algodão CNPA 7H**. Journal of Oil-Seed and Fiber Crops, v. 4, n. 2, p. 61-65, 2000.
- FIROOZABADY, E.; DeBOER, D.L.; MERLO, D.J.; HALK, E.L.; AMERSON, L.N.; RASHKA, K.E.; MURRAY, E.E. **Transformation of cotton (*G. hirsutum* L.) by *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration of transgenic plants**. Plant Molecular Biology, v.10, p.105-116, 1987.
- FIROOZABADY, E.; DeBOER, D.L. **Plant regeneration via somatic embryogenesis in many cultivares of cotton (*Gossypium hirsutum* L.)**. In Vitro Cell Developmental Biology, v.29, p.166-173, 1993.
- GYVES, E.M. **Agrobiotecnología.Iberoamérica**, México, p.78, 1994
- KOONCE, L.; DEVER, J.; BURNS, T.; TROLINDER, N.L. **Progress towards genotype independent transformation**. In: DUGGER, P.; RICHTER, D. eds. National Cotton Council of America: Nashville: Tenn., 1173p., 1996
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. **A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture**. Plant Physiology, v.15 p. 473-497, 1962.
- TACCHINI, P.; WALBOT, V. **Transformation of plants**. Nestlé Research News, p. 19-29, 1986.
- TROLINDER, N.L.; XHIXIAN, C. **Genotype specificity of the somatic embryogenesis response in cotton**. Plant Cell Reports, v.8, p. 133-136, 1989.
- UMBECK, P.; JOHNSON, G.; BARTON, K.; SWAIN, W. **Genetically transformed cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plants**. Biotechnology, v.5, p.263-266, 1987.

27 - TRANSFORMAÇÃO DE PLANTAS DE ALGODOEIRO VIA TUBO POLÍNICO VISANDO O CONTROLE DO BICUDO-DO-ALGODOEIRO, *Anthonomus grandis*.

Oliveira Neto, O.B.¹; Batista, J.A.N.¹; Evangelista, I.B.R.¹; Viana, A.A.B.¹; Cavalcante, K.L.¹; Craveiro, K.I.C.¹ e Grossi de Sá, M.F.¹

¹EMBRAPA - Recursos Genéticos e Biotecnologia.

RESUMO

A incorporação de tecnologias que contribuam para a diminuição dos custos de produção e aumentem a produtividade é de grande valia para o incremento da cotonicultura nacional. Entre as inovações com previsão de expansão nos próximos anos está a transformação de cultivares portando genes de interesse agrônomo e econômico que atendam às exigências do mercado do algodão com relação à qualidade da fibra, resistência a pragas, doenças e estresses ambientais. O algodão é a principal fonte natural de fibras para a indústria têxtil o que torna o seu melhoramento uma preocupação constante. A metodologia de transformação genética de algodão (*Gossypium hirsutum*), ora disponível apresenta baixa eficiência, o que dificulta o seu uso em pesquisas envolvendo a transferência de genes e não permite seu uso de forma ampla em programas de melhoramento genético da cultura. Um método efetivo e reprodutível de transformação de plantas, a partir de células ou tecidos, é essencial em estudos de genética e melhoramento envolvendo a transferência de genes pela engenharia genética. A técnica de transformação via tubo polínico não requer o estabelecimento de um protocolo de cultura de tecidos, que é uma etapa que leva muito tempo é extremamente laboriosa e tem sido apontada pelos especialistas como a que tem limitado sensivelmente o aumento das estatísticas de produção de plantas transgênicas. O objetivo principal deste trabalho é a transformação genética de algodão via tubo polínico, que consiste na aplicação de DNA exógeno no ovário da planta, através da passagem deixada pelo tubo polínico, que vai integrar as células zigóticas, já fertilizadas mas não divididas. Este trabalho faz parte de um esforço coletivo para tornar o Brasil um importante centro produtor de algodão, com um produto competitivo no mercado internacional com variedades transgênicas.

INTRODUÇÃO

A agricultura tem sido um dos pilares da economia brasileira e dentro deste contexto o algodão vem assumindo um novo e importante papel, tanto como gerador de divisas como de empregos diretos e indiretos. A recente vitória de uma representação do Brasil junto a Organização Mundial do Comércio contra os Estados Unidos, em função do subsídio dados aos produtores americanos de algodão (da ordem de US\$ 4 bilhões ao ano) deve incrementar mais ainda o agronegócio do algodão no Brasil.

Desde o aparecimento do bicudo no Brasil em 1983, estudos têm sido conduzidos visando gerar tecnologias que sejam econômica e ecologicamente viáveis para serem utilizadas no seu controle. Entretanto, a maioria dos esforços realizados até hoje tem se concentrado no aspecto agrônomo. Estes esforços têm sido de grande valia, mas o bicudo ainda se mantém como a praga que mais causa prejuízo à cultura do algodão no Brasil. Do ponto de vista da biologia molecular muito pouco tem sido feito visando o controle do bicudo-do-algodoeiro no Brasil., como a de utilizar genes que codificam para proteínas entomotóxicas (δ -endotoxinas, inibidores de enzimas hidrolíticas, lectinas) para obter variedades de algodoeiro geneticamente modificadas resistentes ao bicudo-do-algodoeiro. Atualmente, o nosso grupo conta com vários genes isolados que são candidatos em potencial a serem usados na transformação do algodoeiro (Oliveira Neto *et al.*, 2003; Franco *et al.*, 2004; Oliveira Neto *et al.*, 2004a; 2004b).

A transformação do algodoeiro vem sendo extremamente retardada devido a limitação que são impostas a algumas técnicas pelos cultivares, por exemplo, a técnica de transformação por *Agrobacterium* só funciona para uma cultivar específica. Alguns

pesquisadores já conseguiram um relativo sucesso na transformação de plantas de algodão. Relativo, uma vez que a eficiência da transformação conseguida é baixíssima e de repetibilidade duvidosa.

A tecnologia da transformação do algodoeiro via tubo polínico foi divulgada pela primeira vez por Zhou e colaboradores em 1983 e consiste na aplicação de uma solução de DNA na parte superior da jovem maçã após a polinização, o DNA exógeno pode alcançar o ovário através da passagem deixada pelo tubo polínico e integrar as células zigóticas já fertilizadas mas não divididas.

A obtenção de uma planta transgênica de algodoeiro expressando proteínas entomotóxicas ativas contra o bicudo-do-algodoeiro é o ponto de mais relevante deste trabalho.

MATERIAL E MÉTODOS

Construções gênicas para microinjeções em algodoeiro

Construções com os genes *btc1* e com *tarina*

Foram selecionados dois genes a serem introduzidos no algodoeiro: o gene codificador do inibidor BTCL (inibidor de tripsina Bowman-Birk e inibidor de quimotripsina) e da Tarina (*Tar1*), devido às suas atividades contra o bicudo-do-algodoeiro e lepidópteros, respectivamente. Os genes foram introduzidos em vetores de expressão de plantas sob controle do promotor 35S do vírus do mosaico da couve flor duplicado (CaMV35Sd) e com o enhancer do vírus do mosaico da alfafa (AMV) no vetor da série pCAMBIA (pC2300). Esta construção está sendo utilizada na transformação utilizando microinjeções em plantas de algodoeiro.

*Construção com o gene *cry8ga* sintético*

Para a expressão de toxinas *Bt* em plantas, as seqüências originais dos genes correspondentes foram modificadas. Os genes *Bt* apresentam alto conteúdo de AT sendo comum que estes segmentos sejam interpretados na planta como sinais de terminação, “splicing”, poliadenilação ou outros, levando ao término prematuro, a produção de proteínas truncadas e a um baixo nível de expressão (Diehn *et al.* 1996). Estas modificações consistem em substituir determinados resíduos de nucleotídeos na seqüência original de modo a criar códonos utilizados preferencialmente pela célula vegetal e eliminar possíveis sinais de processamento utilizados pela maquinaria transcricional e traducional das plantas. Para modificar a seqüência do gene *cry8Ga* foi utilizada a metodologia “Template Directed Ligation-PCR”, descrita por Strizhov *et al.* (1996). O desenho do gene *cry8Ga* sintético foi baseado na seqüência do gene *cry8Ga* original, incluindo apenas a parte N-terminal da proteína com os três domínios responsáveis pela atividade inseticida, constituída de cerca de 666 aminoácidos. A seqüência protéica final do gene *cry8Ga* sintético é idêntica a seqüência original.

A construção com o gene *cry8Ga* sintético está em fase final e será utilizada na transformação utilizando microinjeções em plantas de algodoeiro (Batista *et al.*, 2004).

Transformação via tubo polínico

As microinjeções estão sendo feitas diretamente nas maçãs durante a época de floração. As flores do algodoeiro abrem no início da manhã e fecham ao entardecer do mesmo dia, a viabilidade do pólen decresce gradualmente após as 9 horas, embora já se tenha verificado que o pólen permanece hábil para fertilizar proporções acima de 80% após as 17 horas. Vinte e quatro horas após a antese apenas uma pequena parte do pólen ainda é capaz de realizar a fecundação. O algodoeiro é bem peculiar quanto às características da flor. Em um primeiro momento tem-se o botão floral, e após a antese temos a flor de pétalas brancas e em seguida a flor de pétalas roxas. Para os procedimentos da técnica de

transformação via tubo polínico é necessária que já tenha ocorrido polinização com conseqüente desenvolvimento do tubo polínico e fecundação, o que coincide com o aparecimento das flores de cor roxa.

Sendo assim, no dia do aparecimento da flor roxa, o botão correspondente era etiquetado pelo pecíolo com a data e a construção gênica. Em seguida a flor tinha cuidadosamente as pétalas, estames e estigma retirados com objetivo de expor o primórdio de maçã.

A microinjeção foi feita sempre após as 18 horas com uma microseringa do tipo Hamilton e cada maçã recebeu uma dose de 10 µL da construção gênica a uma concentração de 100 ng/mL. A agulha da microseringa foi introduzida verticalmente a uma profundidade de 1/3 da parte superior do primórdio de maçã e a solução com o DNA exógeno liberada.



Figura 1. Diferentes estádios de desenvolvimento da flor do algodoeiro (A) e maçã do algodoeiro sendo microinjetada (B)

Algumas plantas estão em fase de produção de sementes que serão colhidas e submetidas a um teste de seleção. A seleção será feita por PCR com oligonucleotídeos para sítios específicos nas construções gênicas utilizadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tecnologia da transformação do algodoeiro via tubo polínico vem sendo feita no nosso grupo desde agosto de 2004 e trata-se de uma ferramenta com grande potencial para a geração de uma planta transgênica de algodoeiro. Esta metodologia dispensa os protocolos de cultura de tecido o que mostra a princípio ser uma grande vantagem, uma vez a cultura de tecido demandar muito tempo nos protocolos de transformações de plantas.

Devido à baixa umidade relativa em Brasília durante o período das aplicações das microinjeções alguns ajustes foram necessários para a aplicação da técnica de transformação via tubo polínico em nosso laboratório. Um deles foi o horário escolhido para as microinjeções que inicialmente era feito de 6:00 as 8:00 horas da manhã e de 18:00 as 20:00 horas da noite e passaram a ser feitas apenas no horário noturno.

Para os procedimentos da técnica de transformação via tubo polínico é necessária que já tenha ocorrido polinização com conseqüente desenvolvimento do tubo polínico e fecundação. A entrada do tubo polínico no óvulo levará a dupla fecundação que realizará a fusão do primeiro núcleo masculino com a oosfera e a do segundo núcleo masculino com os dois núcleos polares. Estes se mantêm juntos, mas independentemente, até o momento da entrada do núcleo masculino. Imediatamente depois da fusão dos três núcleos se dá a primeira divisão da célula mãe do endosperma. Algumas horas depois já se vêem óvulos com dois núcleos do endosperma e outros com quatro núcleos. A fertilização ocorre 30 horas depois da polinização, entretanto é muito importante frisar que neste momento e nas próximas 24 horas o ovo fecundado permanece indiviso.

O princípio da técnica de transformação via tubo polínico consiste na aplicação de uma microinjeção de DNA na parte superior da maçã jovem do algodoeiro. Após a polinização ocorre a “germinação” do pólen no estigma originando o tubo polínico, o qual se desenvolve até atingir o saco embrionário. Quando a flor chega ao estágio de flor roxa, a polinização e a fecundação já ocorreram, e assim utiliza-se do “canal” deixado pelo tubo polínico e aplica-se o DNA exógeno na porção superior do tubo polínico. Neste estágio de desenvolvimento, apesar da fecundação ter ocorrido o que se tem são células zigóticas não divididas e sem a presença de parede celular o que facilita a integração do DNA exógeno no genoma da planta hospedeira. Esta parte do procedimento técnico é a mais delicada uma vez que qualquer lesão deixada em função da aplicação, que não seja o orifício deixado pela microseringa no ápice da maçã, leva ao abortamento das mesmas.



Figura 2. Maçã microinjetada em franco crescimento (A) em fase de abertura (B) e produzindo (C).

Atualmente o algodão está em fase de colheita das sementes. A produção esperada para esta etapa do trabalho é de aproximadamente 6.000 sementes correspondentes a 168 maçãs microinjetadas.

A próxima etapa consiste em submeter às sementes a um teste de seleção. Como a eficiência da técnica é de 0,1 a 0,5%, e que na variedade que está sendo usada para a transformação tem-se em média 36 sementes por maçã, em 1000 flores é possível ter de 36 até 180 sementes potencialmente transformadas. A seleção será feita por PCR com *primers* para sítios específicos nas construções gênicas utilizadas e com ensaios desafios com canamicina. Também está sendo desenvolvido construções que com genes de resistência a herbicidas, o que facilita o trabalho de seleção dos transformantes.

PERSPECTIVAS

A continuação deste trabalho permitirá avaliar até 220 mil sementes possíveis de serem transformadas, uma vez que após as microinjeções espera-se que uma planta de algodoeiro possa sustentar pelo menos 15 maçãs contendo 36 sementes e a casa-de-vegetação ora usada conta com 600 plantas.

Quanto as construções, vem sendo desenvolvido um projeto em paralelo, no qual um promotor isolado, em nosso grupo, do próprio algodoeiro (*uceA*) está sendo caracterizado de forma a se buscar módulo(s) responsável(is) pela expressão direcionada em botões florais de algodoeiro, local de alimentação e desenvolvimento do bicudo-do-algodoeiro. Com essas análises, far-se-á possível a troca dos promotores (*CaMV35Sd*) pelo(s) módulo(s) responsável(is) pela expressão específica destes genes no botão floral.

Produzir um planta transgênica de algodoeiro via tubo polínico expressando uma proteína entomotóxica que venha conferir resistência contra o bicudo-do-algodoeiro, poderá apresentar uma nova metodologia na manipulação genética de plantas que tem como foco principal a obtenção, em um aspecto mais amplo, de plantas resistente a insetos-pragas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DIEHN, S.H., ROCHER, E.J., GREEN, P.J. Problems that can limit the expression of foreign genes in plants: lessons to be learned from *B.t.* toxin genes. **Genetic Engineering** 18: 83-99, 1996.
- FRANCO OL, DIAS SC, MAGALHAES CP, MONTEIRO AC, BLOCH C JR, MELO FR, OLIVEIRA-NETO OB, MONNERAT RG, GROSSI-DE-SA MF. Effects of soybean Kunitz trypsin inhibitor on the cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*). **Phytochemistry**. 65(1):81-9, 2004.
- OLIVEIRA NETO OB, BATISTA JA, RIGDEN DJ, FRANCO OL, FRAGOSO RR, MONTEIRO AC, MONNERAT RG, GROSSI-DE-SA MF. Molecular cloning of a cysteine proteinase cDNA from the cotton boll weevil *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae) **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, 68(6):1235-42, 2004a.
- OLIVEIRA-NETO OB, BATISTA JA, RIGDEN DJ, FRAGOSO RR, SILVA RO, GOMES EA, FRANCO OL, DIAS SC, CORDEIRO CM, MONNERAT RG, GROSSI-DE-SA MF. A diverse family of serine proteinase genes expressed in cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*): implications for the design of pest-resistant transgenic cotton plants. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 34(9):903-18, 2004b.
- OLIVEIRA-NETO OB, BATISTA JA, RIGDEN DJ, FRANCO OL, FALCAO R, FRAGOSO RR, MELLO LV, DOS SANTOS RC, GROSSI-DE-SA MF. Molecular cloning of alpha-amylases from cotton boll weevil, *Anthonomus grandis* and structural relations to plant inhibitors: an approach to insect resistance. **Journal of Protein Chemistry**, 22(1):77-87, 2003.
- STRIZHOV, N., KELLER, M., MATHUR, J., KONCZ-KÁLMÁN, K., BOSCH, D., PRUDOVSKY, E., SCHELL, J., SNEH, B., KONCZ, C., ZILBERSTEIN, A. A synthetic *cryIC* gene, encoding a *Bacillus thuringiensis* endotoxin, confers *Spodoptera* resistance in alfalfa and tobacco. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, 93: 15012-15017, 1996.
- ZHOU, G., WANG, J., ZENG, Y., HUANG, J., QIAN, S., AND LIU, G.). Introduction of exogenous DNA into cotton embryos. **Methods in Enzymology**, 101:433-448, 1983.

28 – ESTUDOS DA REGENERAÇÃO E TRANSFORMAÇÃO DE PLANTAS DE ALGODÃO VIA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

Paes, N.S.¹; de Lacerda, H.M.¹; Borba, T.C.B.²; Bueno, I.B.E.¹; Cavalcanti, K.L.¹; Craveiro, K.I.C.¹; Cabral, G.B.¹ e Grossi de Sá, M.F.¹.

¹EMBRAPA – Recursos Genéticos e Biotecnologia; ²UnB - Universidade de Brasília, Departamento de Biologia Celular

RESUMO

A regeneração e transformação de plantas de algodão (gênero *Gossypium*) têm sido alvo de estudos em todo o mundo, visto que, notoriamente, é uma das culturas mais recalcitrantes à regeneração *in vitro*. Apesar dos esforços de diversos grupos de pesquisa, ainda hoje a obtenção comercial de algodão geneticamente modificado está limitada às cultivares americanas Coker (*G. hirsutum* L.). Alguns trabalhos mostraram a transformação de outras cultivares, inclusive de outras espécies de algodão, porém, geralmente os métodos utilizados apresentam baixa eficiência ou não são reproduzíveis. O desenvolvimento de um sistema eficiente de regeneração de plantas a partir de células, tecidos ou órgãos vegetais é um dos principais requisitos para a obtenção de plantas transgênicas. Os métodos de regeneração mais utilizados para o algodoeiro são organogênese e embriogênese somática. Embora a organogênese seja considerada genótipo-independente, e portanto, teoricamente capaz de regenerar qualquer variedade, alguns trabalhos mostraram que é freqüente o aparecimento de plantas quiméricas, ou seja, que não são capazes transferir o gene introduzido para a geração F1 (progênie). Já o processo de embriogênese somática, no qual há formação de embriões a partir de células somáticas, apesar de laboriosa e de difícil obtenção, tem sido objeto de várias pesquisas nos países produtores e exportadores de algodão como China, Índia e EUA. Com o intuito de adaptar a metodologia de transformação de algodão às variedades brasileiras, estudos de regeneração e transformação via embriogênese somática estão sendo conduzidos na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Neste trabalho são apresentados os resultados parciais de obtenção e proliferação de calos primários e secundários a partir de segmentos de cotilédone e hipocótilo de *G. hirsutum*, cv. Glandless e Precoc3.

INTRODUÇÃO

Mundialmente, o algodão é uma das culturas agrícolas mais importantes e, no Brasil, vem assumindo cada vez mais destacado papel econômico e social. O aparecimento de doenças e pragas nas lavouras de algodão, aliado à crescente demanda pelo aumento da produtividade e a melhoria da qualidade da fibra impõem a necessidade contínua de melhoramento genético desta cultura. Entretanto, a escassez de genótipos com características agrônômicas desejáveis e a incompatibilidade sexual entre espécies cultivadas e silvestres são fatores limitantes ao desenvolvimento de variedades comerciais de interesse. Atualmente, a clonagem molecular e a transformação genética têm sido consideradas uma importante alternativa ao melhoramento clássico. A possibilidade de transferência de genes entre espécies distantes filogeneticamente permitiu o desenvolvimento de variedades comerciais de algodão tolerantes a herbicida e resistentes a insetos-praga (Wilkins *et al.*, 2000). A introdução, por exemplo, de genes codificadores das toxinas cry de *Bacillus thuringiensis* vem demonstrando uma redução considerável do uso de agrotóxicos naqueles países que comercializam algodão geneticamente modificado (Benedict e Altman, 2001; James *et al.*, 2003).

No mundo inteiro o estabelecimento de um método de transformação para o algodoeiro é condição essencial para a efetiva introdução de genes de interesse nesta cultura. Entretanto, os métodos tradicionais de transformação (mediado por *Agrobacterium tumefaciens* e biolística) estão vinculados ao uso de sistemas eficientes de regeneração, que, em geral, são genótipos-dependentes.

Comparando-se com outras culturas agrícolas, o algodão tem se mostrado recalcitrante à transformação genética, já que a maioria das variedades comerciais apresenta um baixo potencial de regeneração *in vitro*, com exceção das linhagens americanas Coker e de algumas espécies do gênero *Gossypium*. No Brasil, até o momento, apenas a cultivar CNPA Precoce 2 apresentou capacidade embriogênica semelhante à da cultivar Coker 312 (González-Benito *et al.*, 1997).

A regeneração do algodoeiro baseia-se principalmente nos sistemas de organogênese e embriogênese somática. Ambas têm sido utilizadas para a obtenção de plantas transgênicas de algodão. De modo geral, a organogênese é considerada mais promissora para espécies recalcitrantes como algodão (Satyavathi *et al.*, 2002). Nos últimos anos, o sistema de embriogênese somática tem tido grandes avanços, os quais permitiram a regeneração de algumas espécies selvagens do gênero *Gossypium* (Sun *et al.*, 2003; Sakhanokho *et al.*, 2004), de variedades chinesas de *G. hirsutum* (Zhang *et al.*, 2001), além das cultivares tradicionais da linhagem Coker (Kumria *et al.*, 2003; Chaudhary *et al.*, 2003; Kumar *et al.*, 2004; Ikram-ul-Haq e Zafar, 2004).

A embriogênese somática consiste na formação de embriões a partir de células somáticas, podendo ser de maneira direta ou indireta. Alguns tecidos possuem a capacidade de produzir embrióides diretamente, já outros (a maioria) requerem a passagem pela fase de calos até a formação de embriões propriamente ditos. Vários trabalhos de transformação do algodoeiro utilizaram a regeneração via embriogênese indireta, a qual requer um longo período de cultivo *in vitro* (de 6 a 9 meses). Entretanto, o aperfeiçoamento dos protocolos de embriogênese e a identificação mais precisa dos diferentes tipos de calos têm possibilitado a seleção apenas dos calos com potencial embriogênico. Além disso, através da manipulação das condições de cultura (microambiente) e dos fatores nutricionais do meio tem-se conseguido o aceleração do processo de diferenciação e a maturação dos embriões e, conseqüentemente, a redução do tempo de regeneração (4 a 5 meses) (Kumria *et al.*, 2003).

Este método de regeneração e transformação do algodoeiro é considerado um dos mais eficazes, apesar de ser genótipo-dependente. A transformação das células embriogênicas capazes de regenerar uma planta inteira garante a transferência dos genes exógenos à sua progênie, e diminui as chances de ocorrência de plantas quiméricas. Assim, um dos nossos objetivos consistiu na adaptação do protocolo de regeneração e transformação por embriogênese somática às nossas cultivares nacionais de algodão (*G. hirsutum*), cv. Glandless e BRS Cedro. Este trabalho está baseado nos protocolos de Sun *et al.* (2003) e Kumria *et al.* (2003).

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal:

Neste trabalho utilizamos duas cultivares nacionais de *G. hirsutum*: Glandless e CNPA Precoce 3, cedidas pela Embrapa Algodão (CNPA).

Desinfestação e germinação das sementes:

Para a desinfestação, as sementes foram lavadas com detergente comum, permaneceram imersas em álcool 92,8° por 30 minutos, sendo em seguida flambadas, e retirados os tegumentos após uma hora de imersão em água esterilizada. Posteriormente à desinfestação, as sementes foram colocadas para germinar em meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962), por uma semana.

Indução de calos:

Cinco a sete dias após a germinação, segmentos de hipocótilo e pedaços de cotilédone (5 a 10 mm) foram cortados e usados como explantes (8-10 explantes/placa)

para a indução de calos. Para isso, foi utilizado o meio MIC contendo sais de MS, vitaminas de Gamborg (B5), 3% de glicose, 2g/L de fitagel, suplementados com 0,1 mg/L de 2,4-D e 0,5 mg/L de cinetina (pH 5,8), permanecendo cerca de 2 meses a 28±°C e fotoperíodo de 16/8 h (luz/escuro).

Indução e proliferação de calos secundários:

Os calos primários foram, então, transferidos para o meio ME, composto por: sais de MS, vitaminas de Gamborg (B5), 3% de glicose, MgCl₂ 0,75 mg/L, KNO₃ 1,9 g/L, Mio-Inositol 100 mg/L, 0,5 mg/L de 2,4-D, 2,0 mg/L de cinetina, 6,8 mM de glutamina, 3,8mM de asparagina e 2,0 g/L de fitagel (pH 5,8), permanecendo por cerca de um mês. Em seguida foram passados para o meio ME0 (sem os hormônios 2,4-D e cinetina).

RESULTADOS e DISCUSSÃO

Os resultados parciais mostraram que ambas as cultivares apresentaram boa capacidade de formação de calos nas concentrações de 0,1mg/L de 2,4-D e 0,5 mg/L de cinetina (Fig.1). Cerca de um a dois meses após o início da indução de calos, observou-se a ocorrência de variados tipos de calos (Fig. 1). A passagem dos explantes contendo calos primários para o meio ME propiciou o desenvolvimento de calos secundários calos friáveis (de coloração creme) sobre a massa inicial de calos marrons. Estes foram, então, isolados dos explantes e transferidos para o meio ME0 (sem hormônios) (Fig. 2A). A partir daí, houve proliferação desses calos e a mudança de coloração, tornando-se esverdeados (Fig. 2B e 2C). Nesta fase, pode-se observar a formação das primeiras estruturas globulares em algumas regiões dos calos secundários branco-esverdeados (Fig. 2E e 2F). A figura 2D mostra as regiões dos calos onde ocorre uma maior organização celular (pontos escuros apontados com a seta), indicando tratar-se de regiões com elevado potencial embriogênico.

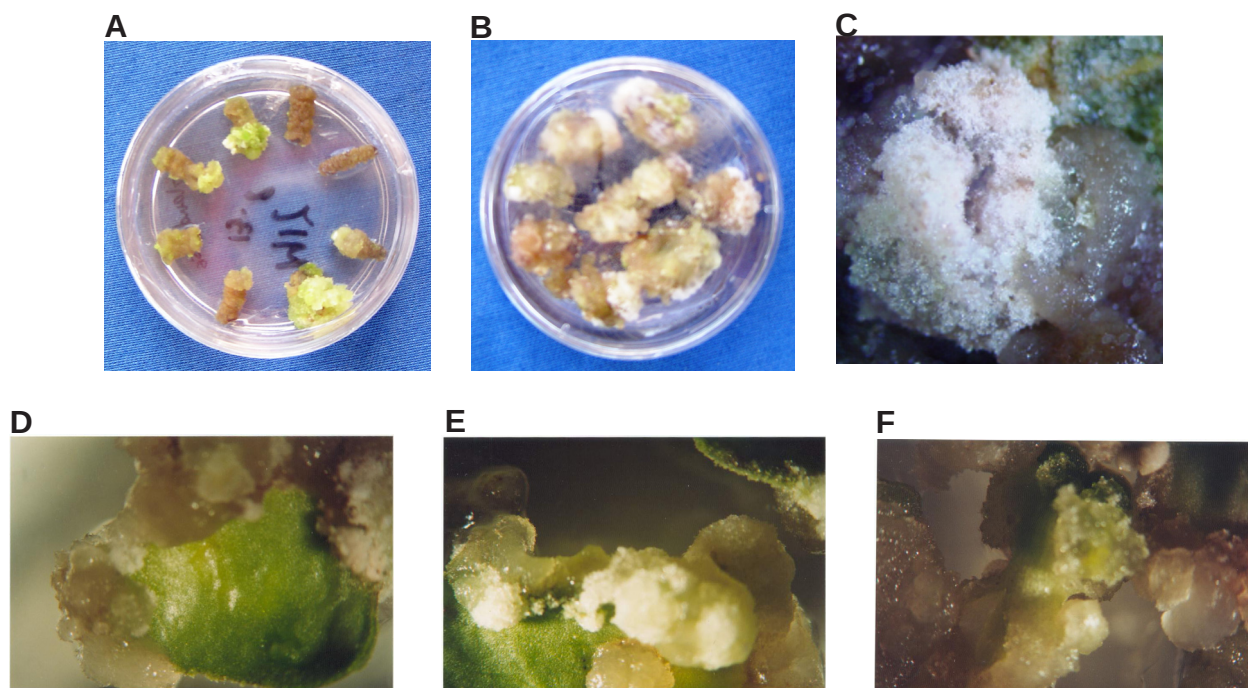


Figura 1. Presença de calos em segmentos de cotilédone e hipocótilo: (A) Calos marrons e verdes na extremidade dos cotilédones; (B) Calos brancos esponjosos; (C) Calos brancos esponjosos e marrons e lisos ao fundo; (D) Detalhe dos calos marrons nas bordas dos cotilédones; (E) Calos brancos e um calo marrom e liso no centro; e (F) Calo esverdeado entre os marrons ao centro.

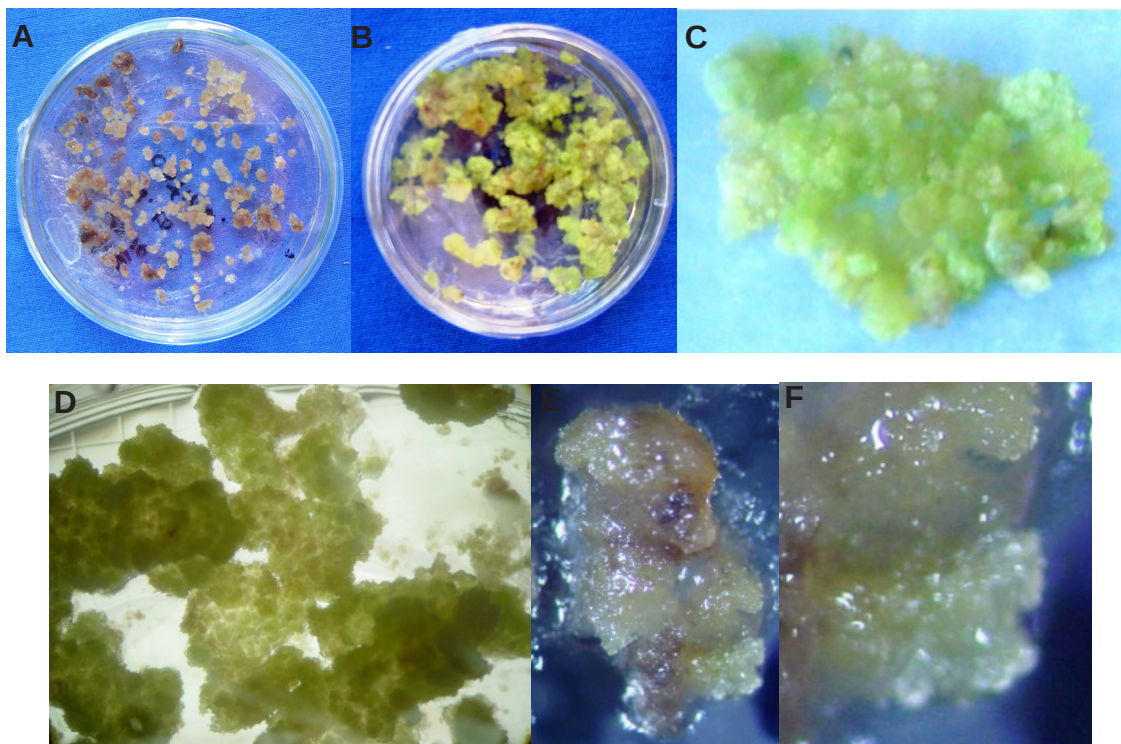


Figura 2: Presença de calos secundários. (A) Calos friáveis (cor marrom ou creme); (B) Calos embriogênicos esverdeados; (C) Detalhe dos calos mostrados em B; (D) O mesmos calos mostrados ao microscópio de contraste de fase destacando-se as regiões de células organizadas (escuras); (E) Um calo embriogênicos em detalhe; e (F) Região do calo anterior mostrando alguns primórdios de embriões globulares.

As pesquisas desenvolvidas neste trabalho basearam-se principalmente no protocolo desenvolvido por Kumria *et al.* (2003) para a obtenção de embriões somáticos de *G. hirsutum* cv. Coker 310. Testamos inicialmente duas variedades brasileiras de algodão – Glandless e Precoce 3, com o intuito de avaliar o seu potencial embriogênico. Nossos resultados preliminares indicam que ambas as cultivares apresentaram semelhante resposta aos meios de indução de calos primários e secundários.

Ultimamente, uma série de relatos sobre embriogênese somática em algodão foi publicada (Sun *et al.*, 2003; Kumria *et al.*, 2003; Sakhanohko *et al.*, 2004; Ikram-ul-Haq e Zafar, 2004), o que revela o crescente interesse neste processo de regeneração para a obtenção de algodão transgênico. Segundo dados, uma vez obtidos os calos embriogênicos e tendo estabelecido o sistema de regeneração *in vitro*, torna-se possível a transformação genética tanto via *A. tumefaciens* quanto biobalística. No entanto, durante anos se utilizaram protocolos extremamente demorados, ou seja, o tempo exigido para a regeneração de plantas de algodão, a partir da embriogênese somática, era demasiadamente longo (6 a 9 meses) e o processo envolvia várias passagens em diferentes meios de cultura, o que praticamente inviabilizava o uso corriqueiro desta técnica. Atualmente, busca-se o seu aperfeiçoamento, visando reduzir esse tempo e desenvolver protocolos adaptados para o maior número possível de cultivares e até mesmo para outras espécies de interesse.

Cada espécie de planta possui um potencial diferenciado de resposta aos hormônios vegetais, bem como às fontes de carbono, nitrogênio e outros elementos essenciais. Com isso, a manipulação das doses e tipos de reguladores de crescimento no meio de cultura sempre serviu de base para os estudos de regeneração. Entretanto, mesmo fazendo-se uma série de combinações de hormônios, no caso do algodão, pouco se avançou em relação à capacidade de gerar plantas férteis a partir de embriões somáticos. Diversos trabalhos com algodão apresentaram uma baixa taxa de obtenção de embriões viáveis, embora se tenha conseguido alguns transformantes (Umbeck *et al.*, 1987 e Finer, 1998).

Observou-se, posteriormente, que a formação de embriões a partir de calos com potencial embriogênico estava fortemente relacionada com a presença de altas doses de KNO_3 no meio de cultura (Ikram-ul-Haq e Zafar, 2004) e que a maturação e a germinação de embriões somáticos ocorriam com elevada frequência sob condições de estresse hídrico no estádio cotiledonar. Alguns trabalhos mostraram que a introdução de papel de filtro e uma tampa porosa nas placas contendo embriões imaturos, por um curto período, ocasionavam a maturação da maioria deles (Kumria *et al.*, 2003; Chaudhary *et al.*, 2003 e Sakhanokho *et al.*, 2004). Assim, a partir de uma cultura de calos embriogênicos provenientes de calos secundários friáveis, a qual pode ser mantida durante meses em meio de proliferação, pode-se utilizá-los como fonte de explante para transformação. A cultura de calos embriogênicos, uma vez estabelecida, é, sem dúvida, uma fonte de tecido altamente promissora tendo em vista a transformação genética do algodoeiro.

Neste trabalho observamos a formação de variados tipos de calos, os quais resultaram na produção e proliferação de calos secundários friáveis (de cor amarelada) para ambas as variedades estudadas, conforme se observa com as cv. americanas Coker 310 e 312. Portanto, os nossos resultados, ainda que preliminares, indicam ser possível a obtenção de calos embriogênicos e a produção de embriões somáticos; bastando, para isso, realizarmos as devidas adaptações nas condições de cultivo (doses ideais de reguladores de crescimento, dessecação, luminosidade adequada, etc) às variedades nacionais de algodão.

PERSPECTIVAS

Uma vez obtidos os embriões somáticos, o objetivo seguinte consiste na maturação e desenvolvimento destes até a regeneração completa, com os sistemas foliar e radicular formados e sua posterior aclimação em casa de vegetação. O estabelecimento adequado dessas etapas representa um grande avanço para a meta principal que é transformação genética das variedades nacionais de algodão. Com isso, será possível, mantendo-se uma cultura de calos embriogênicos permanentemente, agilizar o processo de transformação e regeneração utilizando-se este material como fonte de explante.

A transformação do algodoeiro será feita via *A. tumefaciens*, utilizando os vetores binários já construídos contendo os genes que codificam toxinas *Bt* e inibidores de proteínases, os quais apresentam atividade inibitória contra as lagartas *Spodoptera fugiperda*, *Anticarsia gematalis* e o coleóptero bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis*).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BENEDICT, J.H. & ALTMAN, D.W. Commercialization of transgenic cotton expressing insecticidal crystal protein. In: Jenkins, J.N. & Saha, S. (eds) Genetic improvement of cotton; USDA- Agricultural Research Service, Oxford & IBH, New Delhi, India p. 136-201, 2001.
- CHAUDHARY, R.; KUMAR, S.; PRASAD, K.V.S.K.; OINAM, G.S.; BURNA, P.K. e PENTAL, D. Slow desiccation leads to high-frequency shoot recovery from transformed somatic embryos of cotton (*Gossypium hirsutum* L. cv. Coker 310 FR). **Plant Cell Reports.**, v.21,p. 955-960, 2003.
- FINER, J.J. Plant regeneration from somatic embryogenic suspension cultures of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Plant Cell Reports**, v.7, p. 399-402, 1988.
- GONZÁLES-BENITO, M.E., J.M.C. CARVALHO e C PEREZ..Somatic embryogenesis of na eargy cotton cultivar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.32, p.485-488, 1997.
- IKRAM-UL-HAQ & ZAFAR, U. Effect of netrates on embryo induction efficiency in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **African Journal of Biotechnology**, v. 3, n..6, p. 319-323, 2004.
- JAMES, C. Global Status of Commercialized Transgenic Crops. **ISAAA Briefs** N.30., 2003.
- KUMRIA, R.; SUNNICHAN, V.G.; DAS, D. K.; GUPTA, S.K.; REDDY, V.S.; BAHTNAGAR, R.R. e LEELAVATHI, S.. High-frequency somatic embryo production and maturation into

normal plants in cotton (*Gossypium hirsutum*) through metabolic stress. **Plant Cell Reports**, v.21, p. 635-639, 2003.

LEELAVATHI, SUNNICHAN, V.G.; KUMRIA, R.; VIJAYKANTH, G.P.; BHATNAGAR, R.K. e REDDY, V.S. A simple and rapid *Agrobacterium*-mediated transformation protocol for cotton (*Gossypium hirsutum* L.): Embryogenic calli as a source to generate large numbers of transgenic plants. **Plant Cell Reports**, v. 22, p. 465-470, 2004.

SAKHANOKHO, H.F.; ZIPF, A.; RAJASEKARAN, K.; SAHA, S.; SHARMA, G. e CHEE, P.W. Somatic embryo initiation and germination in diploid cotton (*Gossypium arboreum* L.). **In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant**, v.40, p. 177-181, 2004.

SATYAVATHI, V.V.; PRASAD, V.; LAKSHIMI, B.G.; SITA, G.L. High efficiency transformation protocol for three Indian cotton varieties via *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Science**, v.162, p. 215-22, 2002.

SUN, Y.; ZHANG, X.; JIN, S.; LIANG, S. e NIE, Y. Somatic embryogenesis and plant regeneration in wild cotton (*Gossypium Klotzschianum*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** v.75, p. 247-253, 2003.

UMBECK, P.; JOHNSON, G.; BARTON, K. e SWAIN, W. Genetically transformed cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plants. **Biotechnology**, v.5, p. 263-266, 1987.

ZHANG, B., FENG, R., LIU, F. e WANG, Q.. High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration of an elite Chinese cotton variety. **Bot. Bull. Acad. Sin.**, v. 42, p. 9-16, 2001.

WILKINS, T.A.; RAJASEKARAN, K. e ANDERSON, D.M. Cotton Biotechnology. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 19, n.6, p.511-550, 2000.

29 - OBTENÇÃO DE PLANTAS *Coffea arabica* GENETICAMENTE MODIFICADAS COM GENE PARA INIBIÇÃO DA BROCA.

Machado, F.R.B.^{1,2}; Berçot, M.A.^{1,2}; Dayler, C.^{1,2}; Palácio, T.C.^{1,3}; Vianna¹, G.R.; Paes¹, N. S.; Pereira, A.R.^{1,2}; Grossi-de-Sá, M.F.¹ e Barros, E.V.S.A¹.

¹Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF; ²Universidade de Brasília, Brasília, DF; ³UNICEUB.

RESUMO

O Brasil é mundialmente reconhecido como um dos países mais competitivos na cafeicultura, com uma produção estimada em 42,40 milhões de sacas de café na safra 2004/2005. Entretanto, a agricultura cafeeira sofre enormes prejuízos, pois a espécie *Coffea arabica*, que corresponde por cerca de 82% da produção de grãos, é altamente susceptível a várias pragas e doenças. Assim, estudos intensivos têm sido feitos por parte do melhoramento genético para um maior vigor das plantas associado à resistência, maior produtividade e melhor qualidade do produto. Uma das principais pragas do cafeeiro é a Broca-do-café (*Hypothenemus hampei*), que ataca as espécies de *C. arabica* e *C. canephora* em todos os estádios de maturação do fruto e os grãos armazenados, acarretando perda de peso e qualidade de bebida do produto, o que provoca perdas de 40 milhões de reais por ano. A transformação genética tem sido utilizada recentemente como ferramenta do melhoramento genético de café que permite a seleção de características específicas em genótipos-elite em um reduzido espaço de tempo e sem que ocorra a introdução de genes indesejáveis. Foi demonstrado que o inibidor α -amilase 1 (α -Al1), extraído de *Phaseolus vulgaris* inibe *in vitro* a broca. O objetivo deste trabalho é introduzir o gene α -Al1 em *C. arabica* através da metodologia de transformação por bombardeamento de calos embriogênicos e seleção com canamicina. Calos embriogênicos obtidos a partir de discos foliares de *C. arabica* foram utilizados para o bombardeamento o vetor pCK α -Al1. Este plasmídeo contém o gene α -Al1, o gene repórter *gus*, e o gene *nptII* que confere resistência à canamicina. Foi confirmada a presença dos genes *nptII* e α -Al1 através da técnica de PCR em plântulas crescidas no meio seletivo. As plântulas potencialmente transformadas foram aclimatadas para uma posterior análise molecular. Com esta estratégia, espera-se obter plantas de café resistentes ao ataque da broca.

INTRODUÇÃO

O café (*Coffea spp.*) é um dos produtos agrícolas mais importantes no mercado mundial, proporcionando sete milhões de empregos diretos e indiretos com a produção média de 28 milhões de sacas (Carvalho e Silva, 2003). O Brasil produz cerca de 40% do café comercializado no mundo e ocupa o segundo lugar no consumo desse produto. Entretanto, a cafeicultura brasileira vem sofrendo enormes prejuízos causados, principalmente, por pragas e doenças. Dentre as mais de 80 subdivisões do subgênero *Coffea*, destaca-se a espécie *C. arabica* por ser a mais valorizada comercialmente. Entretanto, essa espécie é altamente susceptível a pragas e doenças, sendo que seu genótipo alotetraplóide e reprodução autógama dificultam o cruzamento com outras espécies para o melhoramento tradicional.

A broca-do-café, *Hypothenemus hampei*, constitui uma das principais pragas em vários países produtores de café das espécies *C. canephora* e *C. arabica*. Esse coleóptero ataca os frutos do cafeeiro em qualquer estado de maturação (Souza e Reis, 1993), causando perdas quantitativas e qualitativas consideráveis.

A transformação genética tem sido utilizada recentemente como ferramenta do melhoramento genético de café para a inserção de características específicas em genótipos-elite. Plantas de café modificadas geneticamente foram obtidas pelo co-cultivo com *Agrobacterium* e pela utilização de RNAi. Entretanto, a técnica de bombardeamento estabelecida em nosso laboratório constitui uma alternativa interessante na transformação de *C. arabica*.

Os inibidores de α -amilases ocorrem naturalmente em muitas plantas. Os insetos que possuem amilases não afetadas por inibidores específicos são bem sucedidos na alimentação. Entretanto, é muito comum plantas apresentarem resistência por possuírem inibidores efetivos contra as enzimas desses insetos.

Visando o controle da broca-do-café, foram desenvolvidas técnicas de transferência do gene α -AI1 em cultivares de *C. arabica*. A broca adulta tem duas α -amilases digestivas principais, cujas atividades são substancialmente inibidas (80%) em baixos níveis de inibidor α -AI1 de feijão comum, *Phaseolus vulgaris* L., conforme demonstrado em ensaios “in vitro” (Valência et al., 2000). Por interação não competitiva, o inibidor impede a ação da amilase, levando as larvas da broca ao déficit nutricional e causando danos em seus parâmetros biológicos, tais como, perda de peso, infertilidade e baixa expectativa de vida.

O objetivo deste trabalho é introduzir o gene α -AI1 em *C. arabica* pelo método de transformação por bombardeamento de calos embriogênicos e seleção em canamicina.

MATERIAIS E MÉTODOS

Indução de Calos Embriogênicos

Explantos foliares (0,8 x 0,8 cm) de *Coffea arabica* L. Catuaí Vermelho cultivadas em casa de vegetação foram utilizados para a obtenção de massa de calos embriogênicos. Os calos foram induzidos em meio C (Van Bostel e Berthouly, 1996) contendo 10 mM 2,4-D, 5 mM 2iP, 5 mM de AIB e 2 % de sacarose (denominado C 20). Os explantes foram mantidos a 25°C no escuro até a formação de calos embriogênicos por aproximadamente 5 meses.

Protocolo de Transformação

A metodologia de transformação de calos embriogênicos de *C. arabica* utilizada foi desenvolvida em nosso laboratório de acordo com Barros et al. 2004 (em preparação). A massa embriogênica foi posicionada em *Membranfilter* 0,45mm sobre meio C com 2,4 – D 10mM, Manitol 0,5 M e fitagel 8g/L para pré-tratamento osmótico. O co-bombardeamento consistiu em 12 tiros, utilizando-se o plasmídeo pCAMBIA2300 que contém o gene *nptII* de resistência a canamicina, e o fragmento correspondente ao cassete de expressão do gene α -AI1 inibidor de α -amilase. A preparação das partículas e os procedimentos do bombardeamento foram baseados no protocolo estabelecido por Aragão et al. (1996). A massa bombardeada foi subcultivada semanalmente em doses crescentes de canamicina (200, 300 e 400 mg/L) em meio C com 2,4 – D 10mM.

Plantas Regenerantes

Após meses de seleção em canamicina, os embriões que atingiram o estágio de torpedo foram transferidos para *babyfood* com WPM (Lloyd e McCown, 1981) contendo carvão ativado e mantidos sob a luz em sala de crescimento a 25°C. As plântulas que desenvolveram raízes tiveram o seu DNA genômico extraído para as análises moleculares e foram aclimatadas em casas de vegetação.

Análise Via PCR

O DNA extraído de folhas das plantas aclimatadas foi baseado no protocolo com CTAB. A técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) foi utilizada para a detecção dos genes da canamicina e do inibidor. Os *primers* para detecção do gene *nptII* (*forward*: 5'-GAG GCT ATT CGG CTA TGA CTG - 3' e *reverse*: 5'- TCG ACAAGA CCG GCT TCC ATC - 3') geraram um fragmento de 410bp; os *primers* para detecção do gene α -AI1 (*forward*: 5'-CCC GGC CCA GGC GGC CGC CAC CGAAAC CTC – 3' e *reverse*: 5'- CCG GCC GGC CTG GCC GAG GAT CTT GTT GAG – 3') um fragmento de 660pb; os *primers* para detecção

de *gus* (*forward*: 5' – CTA CAC CAC GCC GAA CAC CT – 3' e *reverse*: 5'- CAG GCA CAG CAC ATC AAA GA – 3') amplificaram fragmento de 864 pb.

Foram utilizados como controles da reação de PCR os vetores: pTA2, contendo o gene de resistência à ampicilina em bactéria e o gene do inibidor α -AI1; pBI426, contendo o gene de resistência à canamicina em planta (*nptII*) e o gene indicador *gus*.

Cerca de 200ng de DNA foram acrescentados a um *mix* contendo $MgCl_2$ 50 mM, dNTPs 4 mM, 5 unidades de Taq polimerase (pht) e 10 mM de cada *primer*. As condições cíclicas para a detecção do gene *nptII* foram: 95°C por 5min; amplificação: 36 ciclos de 95°C por 1min, 55° C por 1 min e 73°C por 1 min; 73° C por 5 min. Para a detecção de gene α -AI1 foram: 94°C por 2min; amplificação: 30 ciclos de 94°C por 30 seg, 55° C por 30 seg e 72°C por 1 min; 72° C por 2 min.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidas 19 plântulas do bombardeamento denominado de F2300 (fragmento α -AI1 e o plasmídeo pCambia 2300). Uma das plântulas foi aclimatada e analisada por PCR. A análise dos resultados de amplificação dos genes de canamicina e do gene do inibidor demonstrou a presença dos genes *nptII* e α -AI1 (figura 2). Iniciadores para amplificação do gene *gus* foram utilizados como controle negativo, conforme o resultado obtido de não amplificação deste gene. O vetor pTA2 foi utilizado como controle positivo da presença do gene α -AI1 porque a construção do plasmídeo contendo o cassete de expressão do inibidor foi gerado a partir deste vetor. O vetor pBI 426 foi considerado o controle positivo da presença do *nptII*, pois o vetor pCambia 2300 utilizado no bombardeamento apresentou bandas inespecíficas quando amplificado.



Figura 1: Planta bombardeada putativamente transformada em fase de aclimação na casa de vegetação.

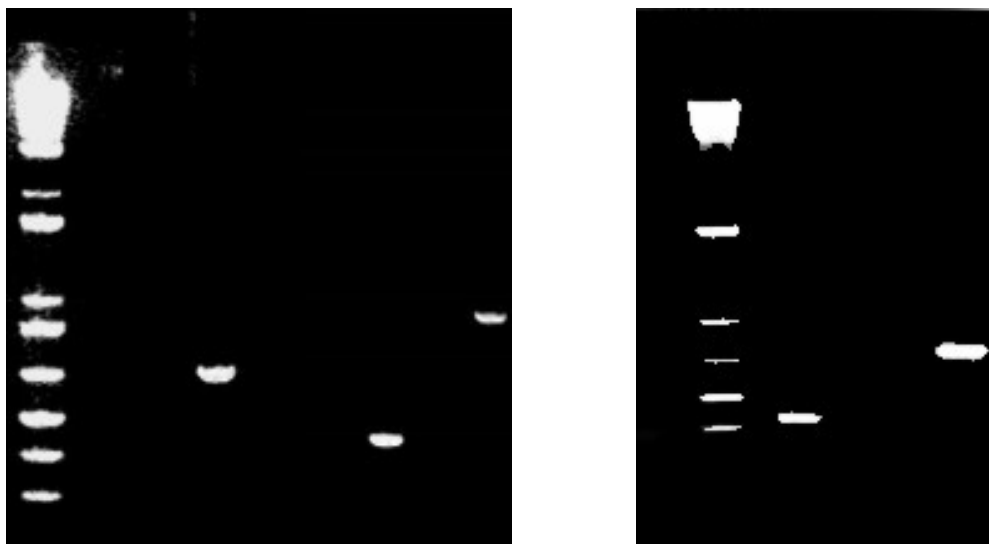


Figura 2: (a) Análise por PCR dos primers para detecção dos genes *nptII*, α -*A11* e *gus* nos vetores controle. Ordem das amostras: (1) 1 Kb plus; vetor pTA2: (2) somente vetor, (3) pTA2 + primers *nptII*, (4) pTA2 + primers α -*A11*, pTA2 + primers *gus* (5); vetor pBI426: (6) somente vetor, pBI426 + primers *nptII* (7), pBI426 + primers α -*A11* (8), pBI426 + primers *gus* (9). **(b)** Análise das amostras da planta putativamente transformada com o fragmento do α -*A11* e com o pCambia2300: (1) 1 Kb plus; (2) DNA + primers *nptII*; (3) DNA+ primers *gus*; (4) DNA + primers α -*A11*.

PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos indicam que a introdução do gene inibidor α -*A11* em *C. arabica* por bombardeamento é viável. As outras plântulas em fase de crescimento serão aclimatadas e analisadas após aclimação. Esperamos obter diferentes eventos de transformação, considerando-se que os embriões regenerantes foram obtidos a partir de diferentes placas de tiro desse experimento. Assim, como não há genes de resistência ao *Hypothenemus hampei* no *pool* gênico do cafeeiro disponível para o melhoramento tradicional, esperamos gerar plantas geneticamente modificadas expressando o gene α -*A11* derivado do feijão comum. Outros genes de inibidores foram clonados e estão sendo avaliados quanto à maior especificidade para a broca do café (Pereira R.A., em preparação).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAGÃO, F.J.L.; BARROS, L.M.G.; BRASILEIRO, A.C.M.; RIBEIRO S.G.; SMITH, F.D.; SANFORD, J.C.; FARIA, J.C; RECH, E.L. Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.) co-transformed via particle bombardeamento. **Theoretical and Applied Genetics** v.93, p.142-150, 1996.
- CARVALHO, M.C.J. E SILVA, R.G. Coordenação do programa integrado de apoio à cafeicultura - pró café.; www.agricultura.gov.br/dfpv/café, setembro 2003.
- COLOMBO, C., M. MALUF, L. RUGGIERO AND O. GUERREIRO FILHO. Biotecnologia: Ajuda ao café. **Cultivar** v. 4, p. 06-08, 2000.
- LLOYD, G., AND B. MCCOWN. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Combined Proceedings / the International Plant Propagators' Society**, v.30, p.421-427, 1981.
- SOUZA, J. C. D., AND P. R. REIS. Broca-do-café: Histórico, reconhecimento, biologia, prejuízos, monitoramento e controle. **Boletim Técnico EPAMIG**, v.40, p. 5-31, 1993.
- VALENCIA, A., A. E. BUSTILLO, G. E. OSSA AND M. J. CHISPEELS. Amylases of the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) and their inhibition by two plant amylase inhibitors. **Insect Biochemical and Molecular Biology**, p. 207-213, 2000.
- VAN BOXTEL, J. & BERTHOULY, M. High frequency somatic embryogenesis from coffee leaves. **Plant Cell Tissue and Organ Culture** v.44, p.7-17, 1996.

30 - REGENERAÇÃO DE PLANTAS DE FEIJÃO AZUKI (*Vigna angularis*) VIA ORGANOGENESE DIRETA

Coutinho, M.V.¹; Costa, M.F.^{1,3}; Silva, R.O.^{1,2}; Paes, N.S.¹ e Grossi de Sá, M.F.¹

¹EMBRAPA – Recursos Genéticos e Biotecnologia; ²UnB - Universidade de Brasília; ³FTB – Faculdade da Terra de Brasília

RESUMO

Este trabalho apresenta os resultados iniciais de regeneração de feijão azuki a partir de transformação com o inibidor de trigo 0.53, sob o controle regulatório do promotor da fitohemaglutinina (pFSMV 10.3). Explantes cortados a partir de epicótilos alongados na presença de 2,4D (1 μ M) ou TDZ (2,5 μ M) foram colocados em meio de co-cultura, sendo inoculados com a cepa EHA 105 de *A. tumefaciens* carregando o vetor binário pFSMV 10.3. Após a co-cultura, os explantes foram transferidos para meios de regeneração contendo diferentes reguladores de crescimento, passando por subcultivos a cada duas semanas. Apenas os explantes germinados na presença de 1 μ M de 2,4D e colocados em meio de regeneração contendo cinetina desenvolveram pró-gemas e a partir destas, multibrotações. Dos 67 explantes, 20 apresentaram pró-gemas a partir do 31º dia pós-semeadura (aproximadamente 30%), dos quais 16 desenvolveram multibrotações. Brotos maiores do que 1 cm foram transferidos para meio de enraizamento (MS sem regulador de crescimento, suplementado com 50 mg L⁻¹ de canamicina e 300 mg L⁻¹ de cefotaxima), onde estão sendo sub-cultivados para posteriores análises moleculares.

INTRODUÇÃO

O feijão comum é a mais importante leguminosa para os países em desenvolvimento, constituindo uma das principais fontes de proteína e calorias, mas é susceptível ao ataque de doenças e insetos-praga. As pragas de armazenamento são responsáveis, no Brasil, por perdas que atingem 10% da produção de grãos (Brasil, 1993). As plantas possuem fatores intrínsecos capazes de proteger suas sementes do ataque de insetos e esses fatores podem ser incorporados a novos cultivares através de processos de melhoramento genético e de técnicas de biologia molecular, as quais tornam possível a transferência de informações genéticas entre espécies, ampliando desta forma as chances de sucesso na obtenção de novos cultivares resistentes a insetos-praga. Grande parte das pesquisas realizadas nesta área tem sido focada nos inibidores de α -amilase, uma vez que essas substâncias impedem a digestão de amido no trato digestivo dos bruquídeos e que estes são altamente dependentes de amido para seu suprimento de energia. Os mais importantes insetos-praga de feijão, no Brasil, são os bruquídeos *Zabrotes subfasciatus*, *Acanthoscelides obtectus* e *Callosobruchus maculatus*. Dentre as proteínas de defesa, o inibidor de α -amilase de trigo 0.53 é de interesse especial por ser uma das poucas proteínas com atividade contra as α -amilases dos três insetos e por mostrar baixa atividade inibitória contra α -amilases de mamíferos (Franco *et al.*, 2002), o que a torna provavelmente viável para programas de melhoramento, através de transformação genética de plantas, sem risco de danos à saúde humana.

Apesar do desenvolvimento de processos para a transformação de diversas culturas, muitos obstáculos precisam ainda ser vencidos para a aplicabilidade desta tecnologia (Cooley *et al.*, 1995; Damm *et al.*, 1989). Os primeiros esforços para produzir plantas de feijão transgênicas não foram bem sucedidos devido à inexistência de sistemas eficientes de transferência de DNA e de regeneração de plantas de feijão (McClean *et al.*, 1991).

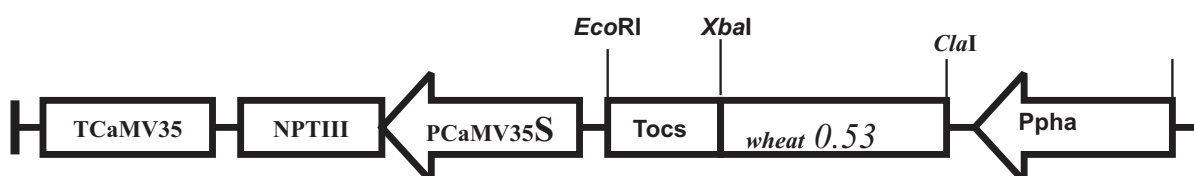
Embora plantas transgênicas de diversas leguminosas da família Phaseolae tenham sido produzidas (Hinchee *et al.*, 1988; McCabe *et al.*, 1988; Dillen *et al.*, 1997; El-Shemy *et al.*, 2002; Aragão *et al.*, 1998; Aragão *et al.*, 1999), a transformação e regeneração ainda não são reproduzíveis em muitos laboratórios.

Dentre as leguminosas, o feijão azuki tem mostrado boa regeneração e a transformação foi alcançada pelo sistema mediado por *Agrobacterium* (Yamada *et al.*, 2001). Feijão azuki não é uma cultura cosmopolita, mas é um membro da tribo Phaseoleae. Assim, o sistema de transformação do azuki pode ser utilizado como um modelo para a compreensão das funções gênicas em grãos de leguminosas. Este trabalho apresenta os resultados iniciais de regeneração de feijão azuki a partir de transformação de explantes de epicótilos com o inibidor de trigo 0.53, visando, inicialmente, desenvolver uma metodologia para as nossas condições e estudar a expressão desse inibidor nas plantas transformadas.

MATERIAL E MÉTODOS

Plasmídeos e Bactéria

O vetor binário pFSMV 10.3, contendo o gene neomicina fosfotransferase II (*nptII*) e o gene codificando para o inibidor de trigo 0.53 (Fig 1) foi usado para a transformação de feijão azuki. O gene neomicina fosfotransferase II (*nptII*), usado como marcador de seleção, confere tolerância ao antibiótico canamicina e está sob o controle regulatório do promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV). O inibidor de trigo 0.53 encontra-se sob o controle regulatório do promotor da fitohemaglutinina. A cepa EHA 105 de *A. tumefaciens* foi usada para transformação de feijão azuki.



Material vegetal e germinação das sementes:

Sementes de feijão azuki compradas no mercado foram desinfestadas superficialmente em etanol 70% por 30 segundos seguido por hipoclorito de sódio 2% durante 15 minutos e 5 lavagens em água destilada autoclavada. As sementes foram semeadas sobre meio basal MS (Murashige e Skoog, 1962) modificado para metade da concentração de macronutrientes e solidificado com 8 g L⁻¹ de ágar contendo 20 g L⁻¹ de sacarose, pH 5,8 e um dos dois reguladores de crescimento: 1 μM de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) ou 2,5 μM de thidiazuron (TDZ). As sementes foram germinadas a 25°C em regime de 5 dias no escuro seguido por 3 dias na luz, 3 dias no escuro e, novamente na luz por 1 dia.

Transformação e seleção de feijão azuki

Epicótilos de plântulas alongadas por 12 dias, conforme descrito anteriormente, foram cortados em pequenos fragmentos com cerca de 10 mm de comprimento (10 explantes por epicótilo, em média), e entre 25 a 30 explantes por placa foram colocados horizontalmente em meio de co-cultivo. Este meio consistiu de sais de MS solidificado com 5 g L⁻¹ de phytigel contendo 20 g L⁻¹ de sacarose, a pH 5,8 com 100 μM de acetoseringona e reguladores de crescimento como indicado na tabela 2. Uma colônia de *A. tumefaciens* cepa EHA 105 carregando o vetor binário pFSMV 10.3 foi crescida a 28°C durante a noite em LB líquido contendo 100 mg L⁻¹ de rifampicina e 100 mg L⁻¹ de canamicina. Células bacterianas foram coletadas por centrifugação e ressuspensas para uma A₆₀₀ entre 0,1 e 0,2 em meio MS líquido contendo 15 g L⁻¹ de glicose, tendo sido colocados 2 μl da suspensão sobre os lados feridos de cada explante. Após dois dias de co-cultura a 25°C no escuro, os explantes foram lavados duas vezes com água destilada autoclavada e o excesso de líquido

foi removido com papel de filtro estéril. Os explantes foram plaqueados horizontalmente sobre meio de regeneração - MR (MS sólido contendo 100 mg L⁻¹ de canamicina e 300 mg L⁻¹ de cefotaxima e reguladores de crescimento conforme tabela 2) e foram incubados a 25°C sob luz branca e fria fluorescente (regime de luz de 16h a 50 -60 μ mol m⁻² s⁻¹). Os explantes foram sub-cultivados a cada duas semanas. As brotações maiores que 1 cm e apresentando mais de duas folhas foram transferidas para meio MS sem reguladores de crescimento, mas contendo 50 mg L⁻¹ de canamicina e 300 mg L⁻¹ de cefotaxima. Essas brotações estão sendo repetidamente selecionadas no mesmo meio para desenvolvimento das raízes e futura transferência para solo, em casa de vegetação, para posteriores análises.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A formação de brotações ocorreu diretamente de tecido globular intumescido e organizado proveniente do câmbio vascular (pró-gemas) de epicótilo. Explantes cortados a partir de epicótilos alongados (Fig. 2a) foram colocados em meio de co-cultura (Fig. 2b), sendo inoculados com a cepa EHA 105 de *A. tumefaciens* carregando o vetor binário pFSMV 10.3. Após a co-cultura, os explantes foram transferidos para meio de regeneração, passando por subcultivos a cada duas semanas. Na presença de 2,4D (1 μ M) os epicótilos alongaram de maneira normal. Por outro lado, a presença de TDZ (2,5 μ M) afetou o desenvolvimento das plântulas, as quais alongaram muito pouco e tiveram a raiz principal engrossada, sem emissão de raízes secundárias, o que reduziu significativamente o número de explantes.

A resposta de azuki aos diferentes meios foi bastante variada. Os explantes germinados em TDZ 2,5 μ M não desenvolveram parte aérea, formando calos friáveis de coloração verde (MR contendo BAP 3 mg L⁻¹) ou ficaram totalmente oxidados (MR contendo TDZ 2,5 μ M ou 10 μ M). Em todos os tratamentos se verificou o desenvolvimento de calos brancos, friáveis e hiper-hidratados tipo “flocos de algodão”, que não regeneraram. O mesmo aconteceu com os explantes originados de epicótilos alongados na presença de 2,4D, quando colocados para regenerar em meio contendo BAP 3 mg L⁻¹, BAP 1 mg L⁻¹ ou TDZ 2,5 μ M. Apenas os explantes germinados na presença de 1 μ M de 2,4D e colocados em meio de regeneração contendo cinetina desenvolveram pró-gemas e a partir destas, multibrotações. Dos 67 explantes, 20 apresentaram pró-gemas (Fig. 2c) a partir do 31º dia pós-semeadura (aproximadamente 30%), dos quais 16 desenvolveram multibrotações (Fig 2. d-e). Brotos maiores do que 1 cm foram transferidos para meio de enraizamento (MS sem regulador de crescimento, suplementado com 50 mg L⁻¹ de canamicina e 300 mg L⁻¹ de cefotaxima), onde estão sendo sub-cultivados para posteriores análises moleculares.

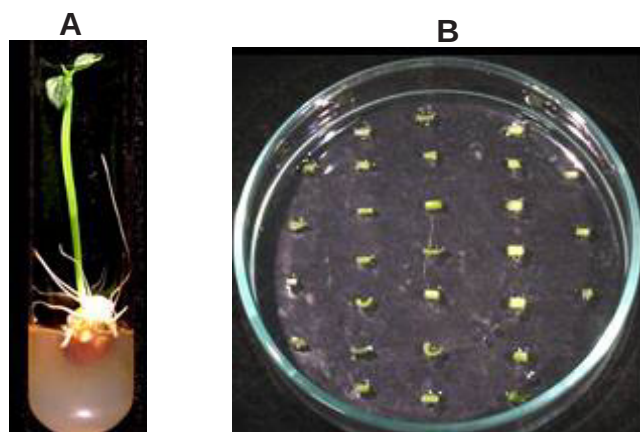
Tabela 2. Efeito de reguladores de crescimento utilizados nos meios de germinação, co-cultura e regeneração sobre explantes de epicótilos de azuki, sobrevivência dos explantes e formação de brotações. DAS - dias após a semeadura.

GERMINAÇÃO	CO-CULTURA	REGENERAÇÃO	Nº DE EXPLANTES			Nº DE BROTACÕES
			14 DAS	27 DAS	31 DAS	46 DAS
2,4D 1 µM	BAP 10 mg L ⁻¹	BAP 3 mg L ⁻¹	12	12	6	0
		BAP 1 mg L ⁻¹	21	11	9	0
	KIN 10 mg L ⁻¹	KIN 1 mg L ⁻¹	67	41	20	16
	TDZ 2,5 µM	TDZ 2,5 µM	87	43	11	0
TDZ 2,5 µM	BAP 10 mg L ⁻¹	BAP 3 mg L ⁻¹	14	10	10	0
	TDZ 2,5 µM	TDZ 2,5 µM	12	3	3	0
	TDZ 10 µM	TDZ 10 µM	10	5	5	0

Um sistema de transformação e regeneração para feijão azuki foi desenvolvido através do sistema mediado por *A. tumefaciens* (El-Shemy *et al.*, 2002). Entretanto, a eficiência de regeneração e concentração ótima de reguladores vegetais de crescimento é genótipo dependente (Yamada *et al.*, 2001) e, por isso, está sendo desenvolvida em nosso laboratório uma metodologia para uma cultivar comercialmente utilizada no Brasil.

Com base em observações feitas a partir de experimentos realizados com feijão de corda em nosso laboratório, os epicótilos foram expostos à luz antes da co-cultura para estimular um balanço hormonal endógeno favorável a citocininas. Foi observado que no tratamento que deu origem ao surgimento de pró-gemas, essas estruturas se formaram e deram origem a multibrotações de forma precoce (cerca de 31 dias pós-germinação), quando comparado ao tempo necessário para obter brotações, a partir de calos descrito por Yamada *et al.*, 2001.

Resultados obtidos com experimentos anteriores indicavam a presença de elevada taxa endógena de auxinas no feijão, o que poderia explicar a formação exagerada do calos friáveis, tipo “flocos de algodão” e, em alguns explantes foi observada apenas a formação de raízes. Este experimento foi, então, montado com o objetivo de se determinar um balanço otimizado de reguladores que favorecesse a rota das citocinina e que eliminasse a formação desse tipo de calos. A combinação que utilizou germinação na presença de 1 µM de 2,4D e o uso de KIN (10 mg L⁻¹ na co-cultura e 1 mg L⁻¹ no meio de regeneração) se mostrou eficiente para a obtenção de organogênese direta, tendo sido adotada para os experimentos seguintes que estão em curso no nosso laboratório. Repetições desse experimento estão sendo montadas a fim de confirmar os resultados obtidos.



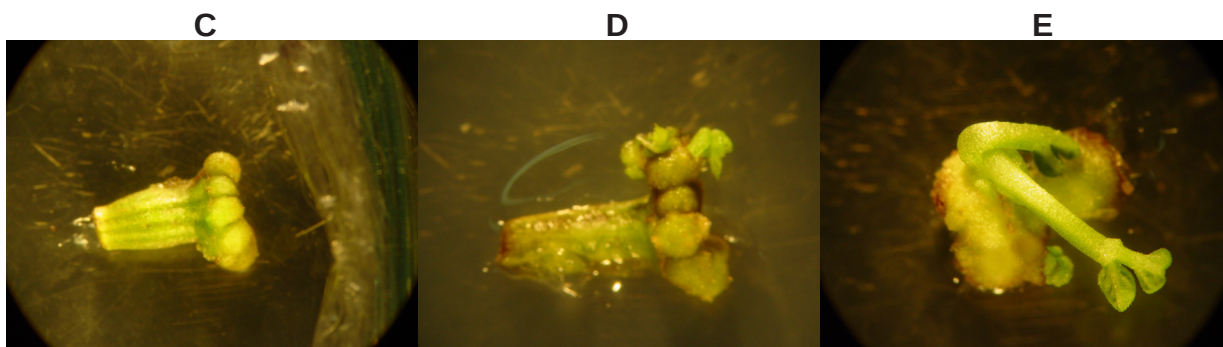


Figura 2: Regeneração de feijão azuki: (a) epicótilo alongado; (b) co-cultura; (c) formação de pró-gemas; (d) multibrotação das pró-gemas; (e) desenvolvimento de uma multibrotação.

PERSPECTIVAS

Algumas observações têm nos sugerido que algumas mudanças podem ser efetuadas a fim de melhorar o procedimento. Por exemplo, uma grande parte dos explantes oxidou completamente ao longo dos sub-cultivos. Nas repetições deste experimento que estão em curso, os explantes cortados a partir do terço superior do epicótilo foram separados dos demais e foi possível observar que enquanto a maioria dos explantes do terço superior permanecem verdes, quase todos os demais se tornam oxidados e morrem. Isso se explica, uma vez que o terço superior está mais próximo da região meristemática apical, sendo mais jovens e tendo maior capacidade de dediferenciação.

A repetição desse experimento permitirá avaliações sobre a eficiência e reprodutibilidade da metodologia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAGÃO, F.J.L.; RIBEIRO, S.G.; BARROS, L.M.G.; BRASILEIRO, A.C.M.; MAXWELL, D.P.; RECH, E.L.; FARIA, J.C. Transgenic beans (*Phaseolus vulgaris* L.) engineered to express viral antisense RNAs show delayed and attenuated symptoms to bean golden mosaic geminivirus. **Molecular Breeding**, v.4, p. 491-499, 1998.
- ARAGÃO, F.J.L.; BARROS, L.M.G.; SOUSA, M.V.; GROSSI DE SÁ, M-F.; ALMEIDA, E.R.P.; GANDER, E.S. RECH, E.L. Expression of a methionine-rich storage albumin from the brazil nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K., LECYTHIDACEAE) IN TRANSGENIC BEAN PLANTS (*Phaseolus vulgaris* L., FABACEAE). **Genetics and Molecular Biology**, v.22, n.3, p. 445-449. 1999
- BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da reforma Agrária. Comissão Técnica para Redução das Perdas na Agropecuária. (Brasília, DF), Perdas na agropecuária brasileira: relatório preliminar. Brasília, v.1, 1993.
- COOLEY, J.; FORD, T. AND CHRISTOU, P. Molecular and genetic characterization of elite transgenic rice plants produced by electric-discharge particle acceleration. **Theoretical Applied Genetics**, v.90, p. 97-104, 1995.
- DAMM, B; SCHMIDT, R. AND WILLMITZER, L. Efficient transformation of *Arabidopsis thaliana* using direct gene transfer to protoplasts. **Mol Gen Genet** , v.217, p. 6-12, 1989.
- DILLEN, W; DE CLERCQ, J.; GOOSENS, A.; VAN MONTAGU, M. AND ANGENON, G. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Phaseolus acutifolius* A. Gray. **Theoretical Applied Genetics**, v. 94, p. 151-158, 1997.
- EL-SHEMY, H.A.; KHALAFALLA, M.; WAKASA, K AND ISHIMOTO, M.. Reproducible transformation in two grain legumes - soybean and azuki bean - using different systems. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v.7, p. 709 – 719, 2002.
- FRANCO, O.L.; RIGDEN, D.J.; MELO, F.R. AND GROSSI DE SÁ, M.F. Plant α -amilase inhibitors and their interaction with insect α -amilases: structure, function and potential for crop protection. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, p. 397-412, 2002.

HINCHEE, M.A.W.; CONNER-WARD, D.V.; NEWELL, C.A.; MCDONNELL, R.E.; SATO, S.J.; GASSER, C.S.; FISCHHOFF, D.A.; RE, D.B.; FRALEY, R.T. AND HORSCH, R.B. Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. **Bio/Technology**, v.6, p. 915-922, 1988.

MCCABE, D.E.; SWAIN, W.F.; MARTINELL, B.J. AND CHRISTOU, P. Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. **Bio/Technology**, v. 6, p. 923-926, 1988.

MCCLEAN, P.; CHEE, P.; HELD, B.; SIMENTAL, J.; DRONG, R.F. AND SLIGHTOM, J. Susceptibility of dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) to *Agrobacterium* infection; transformation of cotyledonary and hypocotyls tissues. **Plant Cell Tissue Org Cult.**, v. 23, p.131-138, 1991.

MURASHIGE, T. AND SKOOG, F.. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiology Plant**, v.15, p. 473-497, 1962.

YAMADA, T.; TERAISHI, M.; HATTORI, T. AND NAKAMURA, K.. Transformation of azuki bean by *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Cell Tissue Organ Cult.**, v. 64, p. 47 – 54, 2001.

31 - REGENERAÇÃO DE FEIJÃO DE CORDA [*Vigna unguiculata* (L.) WALP.]: RESULTADOS INICIAIS DE EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

Coutinho, M.V.¹; Silva, R.O.^{1,2}; Costa, M.F.^{1,3}; Paes, N.S.¹ e Grossi de Sá, M.F.¹

¹EMBRAPA – Recursos Genéticos e Biotecnologia; ²Universidade de Brasília, UnB;

³Faculdade da Terra de Brasília, FTB.

RESUMO

O feijão de corda é um tipo de feijão grandemente consumido pela população do nordeste brasileiro, para a qual constitui uma importante fonte protéica. Apesar de apresentar características agronômicas favoráveis, como tolerância à seca, essa cultura também apresenta problemas, como, por exemplo, susceptibilidade à insetos-praga. O desenvolvimento de novas linhagens geneticamente modificadas com características de resistência a pragas, seria de grande interesse para os produtores daquela região. Alguns autores conseguiram a indução de calos embriogênico (Kulothungan *et al.*, 1995), o desenvolvimento e a maturação de embriões somáticos no estágio cotiledonar e a conversão desses embriões em plantas (Anand *et al.*, 2000). O trabalho aqui descrito descreve os resultados iniciais obtidos para embriogênese somática de cinco cultivares de feijão de corda a partir de cotilédones. As cinco concentrações de 2,4D (1, 5, 10, 20 e 40 µM) utilizadas foram capazes de induzir a formação de calos embriogênicos em todas as cultivares testadas. As concentrações limites de 1 µM e 40 µM favoreceram, respectivamente, o surgimento de raízes adventícias e a oxidação dos explantes. A cultivar Gurgueia apresentou, na concentração de 5 µM de 2,4D alguns embriões globulares que, entretanto, não conseguiram amadurecer. Esses experimentos estão sendo repetidos com a finalidade de reproduzir os resultados obtidos. Ao mesmo tempo, outros explantes estão sendo testados para sua eficiência em formar embriões ou calos embriogênicos.

INTRODUÇÃO

O feijão de corda é uma leguminosa de grande interesse para o nordeste brasileiro. Ela constitui uma importante fonte de proteínas e é uma cultura tolerante à seca, sendo adaptável à diversas condições ambientais (Quin, 1997). Entretanto, a susceptibilidade dessa cultura à pragas ocasiona grandes perdas na produção de grãos.

Embora novas cultivares venham sendo desenvolvidas para características agronômicas desejáveis (Pellegrineschi, 1997), a engenharia genética de caupi pode ajudar a oferecer aos produtores novas alternativas para desenvolver feijão de corda resistente a insetos-praga.

A disponibilidade de um procedimento para regeneração *in vitro* é pré-requisito essencial para a obtenção de plantas geneticamente modificadas. Embora regeneração através de organogênese a partir de diferentes explantes tenha sido descrita para caupi (Karthi *et al.*, 1981; Pandey e Bansal, 1989; Kulothungan *et al.*, 1993; Brar *et al.*, 1997; Muthukumar *et al.*, 1995; Pellegrineschi, 1997; Brar *et al.*, 1999), a frequência de regeneração é baixa e os protocolos não são reproduzíveis. Recentemente, protocolos envolvendo embriogênese somática têm sido considerados sistemas eficientes para regeneração de plantas (Trick e Finer, 1998; Trinh *et al.*, 1998). Kulothungan *et al.*, 1995 conseguiram indução de calos embriogênicos a partir de explantes de folhas primárias de plântulas de caupi em meio MS contendo 9,05 mM de ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4D), mas não foram capazes de obter embriões totalmente maduros nem de recuperar plantas. Outros autores conseguiram a indução de calos embriogênicos, o desenvolvimento desses calos em embriões de diversos formatos, a maturação de embriões somáticos no estágio cotiledonar e a conversão desses embriões em plantas (Anand *et al.*, 2000).

Nesse trabalho, nós pretendemos desenvolver um protocolo de regeneração de feijão de corda a partir de embriogênese somática e utilizá-lo para a obtenção de plantas transgênicas resistentes a insetos-praga.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e germinação das sementes

Sementes de feijão de corda (CV Gurguéia, Guariba, Pitiúba, Rouxinol e Marataoã) foram esterilizadas em etanol 70% por 30 segundos seguido por hipoclorito de sódio 3% durante 20 minutos e 5 lavagens em água destilada esterilizada. Elas foram semeadas sobre meio MSB5, o qual é composto por sais de MS - Murashige e Skoog (Murashige e Skoog, 1962) e vitaminas B5, contendo 30 g L⁻¹ de sacarose e 6 g L⁻¹ de agar (pH 5,8). As sementes foram germinadas a 25°C.

Indução de calos embriogênicos

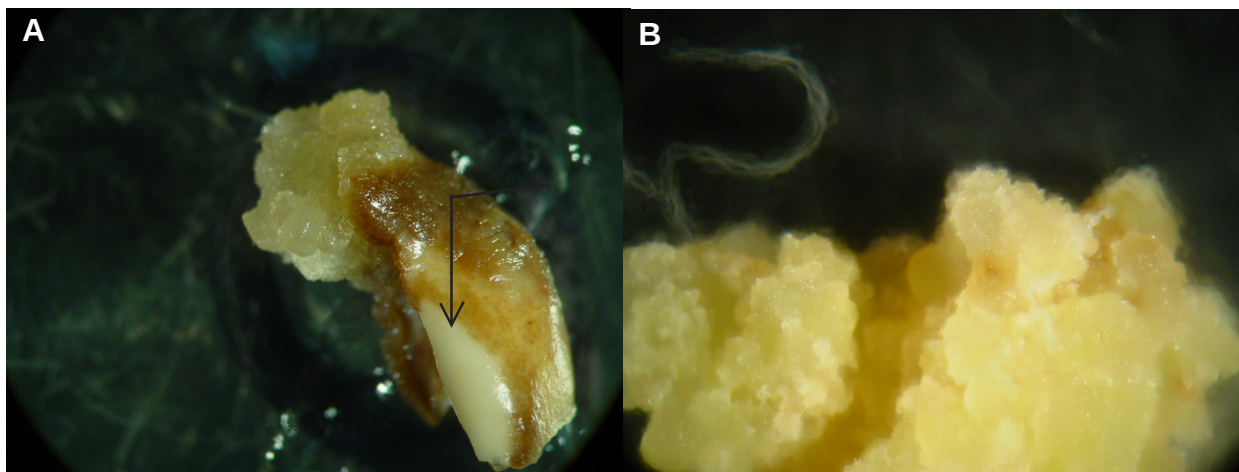
Após 5 dias, cotilédones foram removidos das plântulas que apresentaram boa germinação e colocados em placas de cultura contendo meio MSB5 - pH 7.0 suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) nas concentrações de 1µM, 5µM, 10µM, 20 µM e 40µM e 5 g L⁻¹ de phytigel (meios D1, D5, D10, D20 e D40, respectivamente). Os explantes foram mantidos nesse meio, a 25°C até o desenvolvimento de calos embriogênicos ou embriões (aproximadamente 30 dias).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As cinco cultivares testadas (Gurguéia, Guariba, Marataoã, Pitiúba e Rouxinol) se mostraram promissoras para embriogênese somática, dando origem a calos embriogênico e/ou embriões globulares (Figuras A e B). Essa indução se deu na presença de todas as concentrações de 2,4D usadas, embora a concentração de 1 µM tenha induzido formação de raízes adventícias e na concentração de 40 µM os explantes tenham se tornado bastante oxidados. O número de embriões globulares obtidos, entretanto, foi extremamente baixo e, após 30 dias em cultura, os mesmos pareciam ter seu desenvolvimento estagnado. Foi efetuada uma transferência dos embriões/calos embriogênicos para meio fresco contendo metade da concentração de 2,4D e com isso esperava-se induzir o desenvolvimento dos embriões para os formatos coração, torpedo e cotiledonar. Essa indução não foi obtida, entretanto. Ao contrário, o que se viu foi o surgimento de calos organogênicos esverdeados.

Novos experimentos foram desenhados com a finalidade de se obter uma multiplicação dos embriões globulares e seu subsequente desenvolvimento e amadurecimento. Esses experimentos envolvem o uso de outros tipos de explantes (folhas primárias de plântulas com 5 dias de idade, eixos embrionários maduros e imaturos) e o uso de diferentes concentrações de kinetina aliadas a um maior número de concentrações de 2,4D.

Até essa etapa não foi possível identificar diferenças genotípicas significativas, embora os resultados obtidos com a cultivar Gurguéia na concentração de 5µM de 2,4D tenham diferido de todos os demais. Nessa concentração, um pequeno número de embriões globulares de Gurguéia deu início a um processo de diferenciação alcançando o estágio de coração (Figura C). A repetição desses resultados e a continuidade do processo de diferenciação poderá indicar se Gurguéia é mais facilmente regenerável do que as demais cultivares.



Figuras A e B: indução de embriões globulares após 30 dias na presença de 2,4D 5µM. A) cultivar Guariba; B) cultivar Pitiúba. As setas indicam os embriões no formato globular.

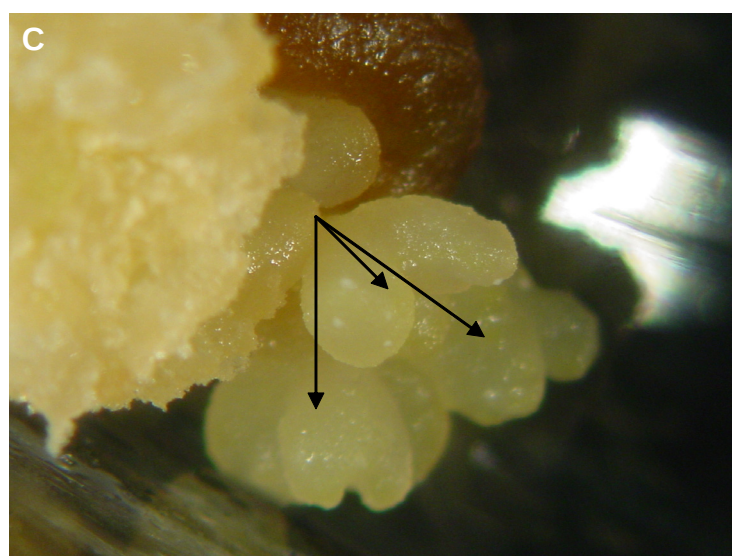


Figura C: surgimento de embriões formato coração em explante de cultivar Gurguéia após 30 dias na presença de 2,4D 5µM..

PERSPECTIVAS

Embora as cinco cultivares e cinco concentrações de 2,4D testadas tenham apresentado capacidade de indução de calos embriogênicos e/ou embriões globulares, a expectativa de sucesso não foi ainda alcançada, em função do número muito pequeno de embriões obtidos e da impossibilidade de seu amadurecimento. Dessa forma, nossos esforços atuais estão centrados em aumentar o número de embriões obtidos e de conseguir sua maturação. Para isso, novos explantes estão sendo testados (eixo embrionário maduro, folhas primárias e, posteriormente, eixo embrionário imaturo). Também serão testadas outras concentrações de 2,4D, assim como a adição de diferentes concentrações de kinetina ao meio de cultura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMITHA, K.; REDDY, T.P. Regeneration of plantlets from different explants and callus cultures of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.). **Phytomorphol**, v. 46, p. 207-211, 1996.

ANAND, R.P.; GANAPATHI, A.; RAMESH ANBVAZHAGAN, V.; VENGADESAN, G. AND SELVARAJ, N. High frequency plant regeneration via somatic embryogenesis in cell suspension cultures of cowpea, *Vigna unguiculata* (L.) Walp. **In vitro Cell Dev Biol. -Plant**. v.36, p. 175-180, 2000.

BRAR, M.S.; AL-KHAYRI, J.M.; MORELOCK, T.E.; ANDERSON, E.J. Genotypic responses of cowpea *Vigna unguiculata* (L.) to *in vitro* regeneration from cotyledon explants. **In Vitro Cell Dev. Biol.-Plant**, v.35, p. 8-12, 1999.

BRAR, M.S.; AL-KHAYRI, J.M.; SHAMBLINN, C.E.; MCNEW, R.W.; MORELOCK, T.E.; ANDERSON, E.J. *In Vitro* shoot tip multiplication of cowpea, *Vigna unguiculata* (L.) Walp. **In vitro Cell Dev Biol. –Plant**, v.33, p. 114-118, 1997.

KARTHA, K.K.; PAHL, K.; LEUNG, N.L.; MROGINSKI, L.A. Plant regeneration from meristems of grain legumes, soybean, cowpea, peanut, chickpea and bean. **Canadian Journal of Botany**, 59: 1671-1679, 1981.

KULOTHUNGAN, S.; BHASKARAN, A.; KASINATHAN, P.; SHAJAHAN, A.; GANAPATHI, A. Morphogenetics studies on excised embryo culture of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. **Legume Res**, v.16, p. 71-74, 1993.

KULOTHUNGAN, S.; GANAPATHI, A.; SHAJAHAN, A.; KATHIRAVAN, K. Somatic embryogenesis in cell suspension culture of cowpea *Vigna unguiculata* (L.) Walp. **Israel J. Plant Science**, v. 43, p. 385-390, 1995.

MUTHUKUMAR, B.; MARIAMMA, M.; GNANAM, A. Regeneration of plant from primary leaves of cowpea. **Plant Cell Tiss. Organ Cult.**, v.42, p. 153-155, 1995.

PANDEY, P.; BANSAL, S.K. Plantlet regeneration from callus cultures of cowpea (*Vigna sinensis* L.) **Current Science**, v.58, p. 394-396, 1989.

PELLEGRINESCHI, A. *In vitro* plant regeneration via organogenesis in cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. **Plant Cell Reports**, v.17, p. 89-95, 1997.

QUIN, F.M. Introduction. In: Sing, B.B.; Mohan Raj, D.R.; Dashiell, K.E.; Jackai, L.E.N. eds. *Advances in Cowpea Research*. Ibadan/Nigeria/Tsukuba, Japan: International Institute of Tropical Agriculture/ Japan International Research Center for Agricultural Sciences; 1997: ix-xv.

TRICK, II N.; FINER, J.J. Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] embryogenic suspension culture tissue. **Plant Cell Reports**, v.17, p.482-488, 1998.

TRINH, T. II.; RATET, P.; KONDOROSI, E.; DURAND, P.; KAMATE, K.; BAUER, P.; KONDOROSI, A. Rapid and efficient transformation of diploid *Medicago truncatula* and *Medicago sativa* spp falcata improved in somatic embryogenesis. **Plant Cell Reports**, v. 17, p. 345-355, 1998.

32 - O QUE FAZ DO GENE *SnOLP* DE *Solanum nigrum* var. *americanum* UM CANDIDATO PARA O CONTROLE DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS?

Campos, M.A.^{1,2}, Ribeiro, S.G.¹, Silva, M.S.¹, Magalhães, C.P.¹, Del Sarto, R.P.¹, Lacorte, C.¹, Rigden, D.J.¹, Monte, D.C.¹ e Grossi-de Sá, M.F.¹

¹Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia; ²Universidade Federal de Lavras.

RESUMO

Genes *PR-5* (*pathogenesis-related*) cujas proteínas codificadas possuem atividade contra fungos e oomicetos fitopatogênicos têm potencial para aplicação em engenharia genética de plantas, visando resistência a esses patógenos. Como uma abordagem a este enfoque, dois genes *PR-5*, denominados *SnOLP* e *SnOSML*, foram recentemente clonados a partir do genoma de *Solanum nigrum* var. *americanum*. A seqüência deduzida de *SnOLP* indica ser uma isoforma neutra, contendo 207 aminoácidos e os dezesseis resíduos de cisteínas envolvidos em oito pontes de sulfeto, comuns à maioria das proteínas *PR-5*. Um indicativo de atividade antifúngica para *SnOLP* foi revelado por um modelo computacional de sua seqüência predita. Para confirmar esta hipótese, a proteína *SnOLP* foi expressa em *Escherichia coli* na forma madura recombinante, purificada em cromatografia de afinidade por metais (Ni) e renaturada para uma forma ativa. Atividade antimicrobiana foi demonstrada *in vitro* sobre a inibição da extensão da hifa de fungos e, especialmente de oomicetos, de uma maneira dose dependente. Estudos de expressão heteróloga *in planta* estão sendo conduzidos em plantas transgênicas de fumo contendo o gene *SnOLP* na orientação senso ou antisense, obtidas após transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. A confirmação da integração do T-DNA nestas plantas foi verificada por PCR em transformantes R_0 e por ensaio de segregação da resistência a higromicina em plantas R_1 . Como resultado, sementes de duas linhagens R_0 foram selecionadas para desafiar plantas R_1 com fungos e oomicetos. Os resultados obtidos nesta pesquisa dão evidências do potencial de *SnOLP* para aplicação na agricultura. Além disso, outras características dessa família de genes e da planta maria preta fortalecem a hipótese de que *SnOLP* é um candidato para a elaboração de estratégias de controle de fungos e oomicetos em plantas transgênicas de interesse econômico.

INTRODUÇÃO

Genes que codificam para proteínas relacionadas com a patogênese (proteínas *PR*) têm potencial aplicação em Biotecnologia. Na família de proteínas *PR-5* constam proteínas com diversas funções. Proteínas *PR-5* de plantas desempenham um papel no desenvolvimento, proteção contra estresse osmótico e tolerância ao frio e também possuem atividade direta contra fungos e oomicetos. Esta atividade tem sido demonstrada *in vitro* para vários fungos, fitopatogênicos ou não, e para o oomiceto *Phytophthora infestans*. Além disso, plantas transgênicas expressando constitutivamente o gene da osmotina de fumo ou o gene de uma OLP (*OSM13*) de batata (*Solanum commersonii*) apresentaram aumentada resistência à infecção por *P. infestans* (Liu *et al.*, 1994; Li *et al.*, 1999). Os mecanismos moleculares pelos quais proteínas *PR-5* são capazes de inibir o crescimento *in vitro* da hifa e a germinação de esporos, de lisar esporos e de reduzir a viabilidade de esporos germinados, ainda não estão bem entendidos. Entre os mecanismos propostos estão: 1) permeabilização da membrana celular de fungos e oomicetos, devido à habilidade destas proteínas causarem uma rápida liberação do conteúdo citoplasmático de células de fungos (Roberts e Selitrennikoff, 1990; Abad *et al.*, 1996; Anzlovar *et al.*, 1998); 2) capacidade de ligarem-se a b-1,3-glucanas (Trudel *et al.*, 1998) e/ou de possuírem atividade de b-1,3-glucanases (Grenier *et al.*, 1999); 3) atividade de quitinase (Pan *et al.*, 1999); 4) capacidade de ligarem-se a actina (Takemoto *et al.*, 1997). No entanto, a demonstração de que a

osmotina de fumo induz apoptose no ascomiceto unicelular *Saccharomyces cerevisiae* é um relato importante sobre o modo de ação de proteínas PR-5 (Narasimhan *et al.*, 2001). A busca por novas proteínas naturais com aumentada atividade antifúngica continua. Visando à elaboração de estratégias eficientes para a engenharia genética da resistência a doenças de plantas, proteínas antifúngicas têm sido prospectadas tanto em plantas quanto em organismos diferentes de plantas. A utilização de uma espécie selvagem de *Solanum*, considerada não-hospedeira de diversos patógenos fúngicos, como fonte natural de proteínas com atividade antifúngica aumentada, representa um avanço promissor para o entendimento e exploração dos mecanismos de resistência observados. Desta forma, partindo-se da prospecção de genes do tipo PR-5, no genoma de *Solanum nigrum* var. *Americanum*, levando à expressão heteróloga em plantas transgênicas, têm-se uma estratégia alternativa para a obtenção de plantas resistentes a fungos e oomicetos. A natureza desta resistência pode, em princípio, alterar o processo co-evolutivo patógeno-hospedeiro, o que pode significar uma resistência mais duradoura. Neste sentido, este trabalho apresenta a caracterização de um gene PR-5 de *Solanum nigrum*, sua expressão heteróloga e potencial uso no controle de fungos e oomicetos fitopatogênicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Amplificação por PCR de genes do tipo PR-5 de *Solanum nigrum* var. *americanum*

A clonagem dos genes *SnOLP* e *SnOSM* a partir do genoma de Maria Pretinha (*Solanum nigrum* L. var. *americanum*) está descrita em Campos *et al.* (2002). Oligonucleotídeos foram desenhados com base em alinhamento de seqüências do banco de dados NCBI, denominados PPS1/PCTP e PPM1/PPM2 (Figura 1). A especificidade dos produtos de PCR foi verificada por *Southern blot* usando uma sonda de gene homólogo de *Solanum gilo* (Campos, 2002). Em seguida, os produtos de PCR foram seqüenciados e as seqüências analisadas usando o pacote de programas UWGCG (versão 9.1 Genetic Computer Group, Wisconsin) e DNAMAN (versão 4.0, Lynnon Biosoft). As seqüências gênicas correspondentes as proteínas *SnOLP* e *SnOSM* estão depositadas no GenBank NCBI com os números de acesso AF450276 e AF450277, respectivamente. Um modelo computacional de estruturas para as proteínas preditas *SnOLP* e *SnOSM* foi gerado, utilizando o MODELLER (Sali e Bludell, 1993), baseado na estrutura tri-dimensional da proteína PR5d neutra de *Nicotiana tabacum* (Identificador da proteína no banco de dados: 1AUN; Koiwa *et al.*, 1999), conforme descrito em Campos *et al.* (2002).

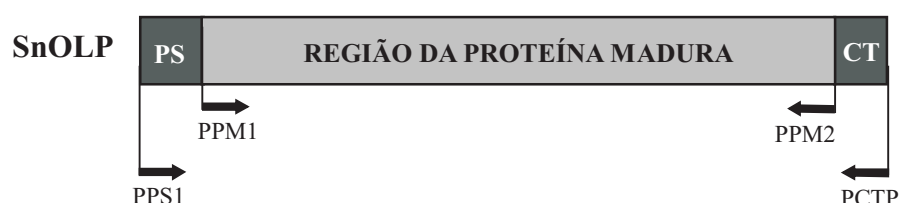


Figura 1. Representação esquemática do gene *SnOLP*, indicando as regiões que codificam para um peptídeo sinal (PS), para a proteína madura após processamento pós-traducional e para um peptídeo carboxi-terminal vacuolar (CT), o qual está ausente em algumas isoformas. As setas indicam a posição dos primers utilizados para amplificar a ORF completa (PPS1/PCTP) ou apenas a região que codifica para a proteína madura (PPM1/PPM2).

Expressão em *Escherichia coli* e Purificação de *SnOLP*

A seqüência gênica codante para a região da proteína madura de *SnOLP* foi amplificada por PCR usando os primers PPM1 e PPM2 (Figura 1), de modo a excluir os peptídeos sinal e carboxi-terminal da proteína *SnOLP*, e clonada no vetor de expressão pQE30 (Qiagen). Culturas de *E. coli* foram crescidas a 37°C induzidas por IPTG. A proteína

SnOLP madura recombinante foi expressa e purificada na forma de corpo de inclusão por cromatografia de afinidade por metais (Ni). A proteína $_6$ His-SnOLP madura purificada foi renaturada em tampão renaturante contendo Glutathione oxidada:reduzida, dializada em água, liofilizada, ressuspensa em água e usada em ensaios da atividade sobre o crescimento *in vitro* de fungos.

Ensaio *in vitro* da atividade antifúngica de $_6$ His-SnOLP madura

O ensaio da atividade da proteína $_6$ His-SnOLP foi realizado *in vitro* na forma de antibiograma, com avaliação visual da inibição da extensão da hifa de fungos anamorfos de Ascomicetos fitopatogênicos. Os fungos utilizados nos ensaios foram *Macrophomina phaseolina*, *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. Além desses, utilizou-se também o oomiceto *Phytophthora nicotiana* var. *parasitica*.

Transformação de *Nicotiana tabacum* com SnOLP

Vetores binários conduzindo a ORF completa de SnOLP, senso ou antisenso, sob controle do promotor Ubiquitina3 de *Arabidopsis thaliana*, foram construídos para expressão *in planta*. Estes vetores foram introduzidos em *Agrobacterium tumefaciens* e plantas de *Nicotiana tabacum* foram transformadas. A confirmação da integração do T-DNA foi verificada por PCR em transformantes R₀ e por ensaio de segregação da resistência a higromicina em plantas R₁.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esta pesquisa tem o mérito de expor o primeiro relato sobre a clonagem e caracterização de genes PR-5 a partir do genoma de maria preta (*Solanum nigrum* L. var. *americanum*). Duas seqüências gênicas, denominadas SnOLP e SnOSML, foram isoladas, as quais devem ser parte de uma família multigênica nesta Solanácea silvestre, como já foi relatado para outras PR-5. SnOLP constitui uma ORF completa de um gene do genoma de *S. nigrum* que codifica uma preproteína do tipo PR-5, potencialmente neutra, contendo um aminopeptídeo sinal (PS) e um carboxi-terminal (CT). SnOSML compreende parte de uma ORF de um gene que codifica uma PR-5 correspondente a uma seqüência completa de uma isoforma básica em *S. nigrum*. As duas proteínas maduras preditas possuem 207 aminoácidos e contêm os dezesseis resíduos de cisteínas envolvidos em oito pontes de sulfeto, comuns a maioria das proteínas PR-5. A modelagem computacional das duas seqüências revelou estruturas que são indicativas de atividade antifúngica (Campos *et al.*, 2002), que são os dois domínios funcionais vistos para a proteína PR5d de *Nicotiana glauca* (Koiwa *et al.*, 1999).

Baseando-se na hipótese de que estes genes poderiam codificar proteínas funcionais, a expressão de SnOLP em *Escherichia coli* foi realizada. Como resultado, grande quantidade de proteína SnOLP madura contendo uma calda de histidina foi obtida na forma insolúvel, como corpo de inclusão (Figura 2a). Os corpos de inclusão foram solubilizados em uréia e a proteína foi purificada em cromatografia de afinidade por Ni (Figura 2b).

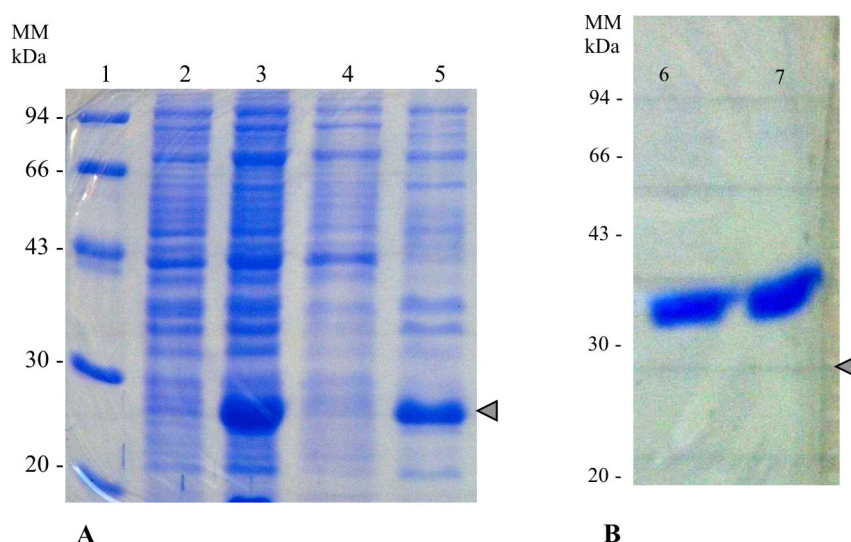


Figura 2. Expressão de $_6\text{His}$ -SnOLP madura em *Escherichia coli* (A) e purificação (B). Marcador de massa molecular (1). Proteínas totais da cultura de células não induzidas (2) e induzidas com IPTG (3). Igual quantidade de proteína de fusão solúvel (4) e insolúvel (5). Corpos de inclusão solubilizados e purificados (6 e 7). O gel de SDS-PAGE foi corado com azul de Coomassie.

A proteína $_6\text{His}$ -SnOLP madura renaturada, dializada e ressuspensa em água foi usada em ensaios da atividade contra fungos. Num primeiro ensaio, a atividade da proteína foi observada, antes da quantificação, contra o crescimento de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, agente causal da ramulose em algodoeiro (Figura 3). O elevado efeito inibitório resulta a presença alta concentração de $_6\text{His}$ -SnOLP nas frações usadas.

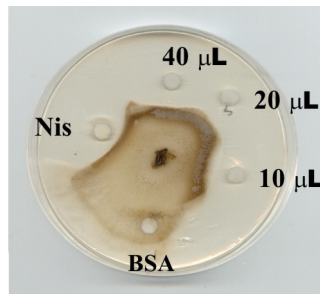


Figura 3. Ensaio de inibição da extensão da hifa de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* com $_6\text{His}$ -SnOLP madura renaturada de *Solanum nigrum* var. *amaricanum*. Os discos contêm 10, 20 e 40 mL de $_6\text{His}$ -SnOLP; BSA, *bovine serum albumine* 10 mg; Nis, Nistatina 2000 U.

Em seguida, a quantidade mínima necessária para inibir a extensão da hifa de fungos e de oomicetos *in vitro* foi testada para *Macrophomina phaseolina*, *Colletotrichum gloeosporioides*, os quais foram inibidos por apenas 2 mg de proteína, e para *Phytophthora nicotiana* var. *parasitica* (dados não mostrados). Nistatina é um antifúngico produzido por *Streptomyces noursei* que apresenta atividade contra grande variedade de leveduras e fungos leveduriformes. No entanto, nistatina foi ineficiente em inibir a extensão da hifa de *P. parasitica*, enquanto que apenas baixa concentração de $_6\text{His}$ -SnOLP (3 mg) mostrou efeito inibitório (dados não mostrados). O potencial citotóxico desta proteína é refletido na capacidade inibitória a baixas concentrações, enquanto que outras PR-5 descritas na literatura possuem atividade antimicrobiana sob concentrações acima de 10 mg (Abad *et al.*, 1996).

Estudos sobre a expressão heteróloga de SnOLP *in planta* estão em fase avançada. Plantas transgênicas de fumo conduzindo o gene SnOLP senso e antisenso foram produzidas

e sementes foram colhidas. Análise de segregação do T-DNA em plântulas transgênicas R_1 foi realizada pela germinação de sementes no agente de seleção higromicina, resultando no padrão de segregação esperado, 3:1 (Figura 4).

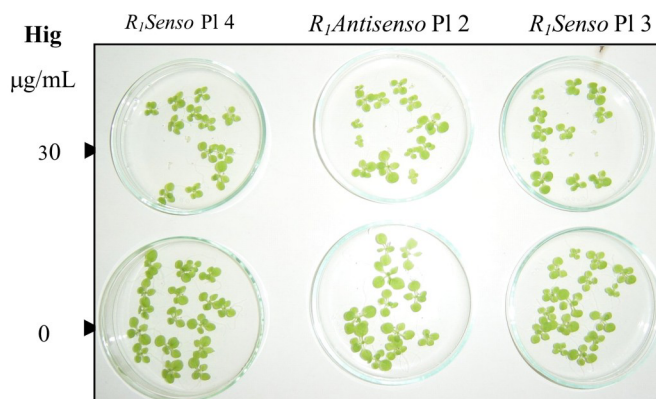


Figura 4. Plântulas R_1 de três linhagens de fumo transgênico após 10 dias de crescimento em ensaio de segregação. Plântulas R_1 de *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi transformadas com o *SnOLP* na orientação senso (linhagens 3 and 4) estão identificadas como R_1 Senso PI 3 and 4, enquanto que aquelas na orientação antisenso (linhagem 2) estão indicadas como R_1 Antisenso PI 2.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Este trabalho explora o potencial do gene *SnOLP* como valiosa ferramenta para aplicação em biotecnologia. A proteína SNOLP usada nos experimentos pode representar uma das mais potentes versões disponíveis na natureza. Além de *Nicotiana glauca* ser considerada uma planta não hospedeira de muitos patógenos fúngicos e especialmente de *Phytophthora* spp., a participação de proteínas PR-5 na imunidade inata desta espécie já foi demonstrada. Por ter sido isolado de uma Solanácea, supõe-se que *SnOLP* seja efetivamente expresso em cultivares comerciais de solanáceas economicamente importantes, como tomate e batata, com possível incremento na resistência delas a *Phytophthora infestans*. A prospecção de genes tropicais, os quais têm amplas possibilidades de se adaptarem a climas subtropicais e temperados, representa uma grande vantagem comparativa e competitiva. Por outro lado, genes de plantas com características de interesse para a geração de produtos transgênicos oferecem uma vantagem de biossegurança em relação àqueles de origem 'não plantas'.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD L.R., D'URZO M.P., LIU D., NARASIMHAN M.L., REUVENI M., ZHU J.K., NIU X., SINGH N.K., HASEGAWA P.M. E BRESSAN R.A. Antifungal activity of tobacco osmotin has specificity and involves plasma membrane permeabilization. **Plant Science** 118: 11-123. 1996.

ANZLOVAR S., SERRA M.D., DEMASTIA M. E MENESTRINA G. Membrane permeabilizing of pathogenesis-related protein linusitin from flax seed. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 7: 610-617. 1998.

CAMPOS M.A. Prospecção de genes do tipo PR-5 em Solanáceas selvagens: clonagem, caracterização e potencial uso no controle de patógenos fúngicos com plantas transgênicas / Magnólia de Araújo Campos / Tese de Doutorado, Universidade de Brasília. 2002. 192 p. CAMPOS M.A., RIBEIRO S.G., RIGDEN D.J., MONTE D.C. E GROSSI DE SÁ. Putative pathogenesis-related genes within *Solanum nigrum* var. *americanum* genome: isolation of

two genes coding for PR5-like proteins, phylogenetic and sequence analysis. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 61: 205-216, 2002.

DAVE R.S. E MITRA R.K. A low temperature induced apoplastic protein isolated from *Arachis hypogaea*. **Phytochemistry** 49: 2207-2213. 1998.

GRENIER J., POTVIN C., TRUDEL J. E ASSELIN A. Some thaumatin-like proteins hydrolyse polymeric β -1,3-glucans. **The Plant Journal** 19: 473-480. 1999.

KOIWA H., KATO H., NAKATSU T., ODA J., YAMADA Y. E SATO F. Crystal structure of tobacco PR-5d protein at 1.8 Å resolution reveals a conserved acidic cleft structure in antifungal thaumatin-like proteins. **Journal of Molecular Biology** 286: 1137-1145. 1999.

LI R., WU N., FAN Y. E SONG B. Transgenic potato plants expressing osmotin gene inhibits fungal development in inoculated leaves. **Chinese Journal of Biotechnology** 15:71-75. 1999.

LIU D., RAGHOTHAMA K.G., HASEGAWA P.M. E BRESSAN R.A. Osmotin overexpression in potato delays development of disease symptoms. **Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.** 91: 1888-1892. 1994.

NARASIMHAN M.L., DAMSZ B., COCA M.A., IBEAS J.I., YUN D.J., PARDO J.M., HASEGAWA P.M. E BRESSAN R.A. A plant defense response effector induces microbial apoptosis. **Molecular Cell** 8: 921-930. 2001.

PAN C.H., LEE E.A., CHAE Y.A. E KIM S.I. Purification of chitinolytic protein from *Rehmannia glutinosa* showing N-terminal amino acid sequence similarity to thaumatin-like proteins. **Bioscience Biotechnology Biochem.** 63: 1138-1140. 1999.

ROBERTS W.K. E SELITRENNIKOFF C.P. Zeamatin, an antifungal protein from maize with membrane-permeabilizing activity. **Journal of General Microbiology** 136: 1771-1778. 1990.

SALI A. AND BLUNDELL T.L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. **Journal of Molecular Biology** 234:779-815. 1993.

TAKEMOTO D., KATSUMI F., DOKE N. AND KAWAKITA K. Identification of chitinase and osmotin-like protein as actin-binding proteins in suspension-cultures potato cells. **Plant Cell Physiology** 38: 441-448. 1997.