

**EVOLUÇÃO MOLECULAR *IN VITRO*: SELEÇÃO DE MOLÉCULAS INSETICIDAS  
PARA INSETOS-PRAGA DO ALGODOEIRO**

## **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**

*Luis Carlos Guedes Pinto*  
Presidente

*Silvio Crestana*  
Vice-Presidente

*Alexandre Kalil Pires*  
*Ernesto Paterniani*  
*Helio Tollini*  
*Marcelo Barbosa Saintive*  
Membros

### **Diretoria-Executiva da Embrapa**

*Silvio Crestana*  
Diretor Presidente

*José Geraldo Eugênio de França*  
*Kepler Euclides Filho*  
*Tatiana Deane de Abreu Sá*  
Diretores Executivos

### **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**

*José Manuel Cabral de Sousa 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

# **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 99**

## **EVOLUÇÃO MOLECULAR *IN VITRO*: SELEÇÃO DE MOLÉCULAS INSETICIDAS PARA INSETOS-PRAGA DO ALGODOEIRO**

**M. Cristina Mattar da Silva**

**Patrícia S. F. Brunetta**

**Edson L. Z. Figueira**

**Mariana T. Q. Magalhães**

**Gustavo R. Oliveira**

**Hudson B. Ramos**

**Rafael P. del Sarto**

**Cleiton M. Cruz**

**Raquel S. Oliveira**

**Keline L. Cavalcanti**

**Kilvia Craveiro**

**Aulus E. A. D. Barbosa**

**Norma S. Paes**

**Thales L. Rocha**

**Fabiola, R. Teixeira**

**Marise V. Coutinho**

**Maria Fátima Grossi-de-Sá**

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na

### **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**

Serviço de Atendimento ao Cidadão

Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) –

Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 3348-4739 Fax: (61) 3340-3666 <http://www.cenargen.embrapa.br>

e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

### **Comitê de Publicações**

Presidente: *Maria Isabel de Oliveira Penteado*

Secretário-Executivo: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

Membros: *Arthur da Silva Mariante*

*Maria Alice Bianchi*

*Maria de Fátima Batista*

*Maurício Machain Franco*

*Regina Maria Dechechi Carneiro*

*Sueli Correa Marques de Mello*

*Vera Tavares de Campos Carneiro*

Supervisor editorial: *Maria da Graça S. P. Negrão*

Normalização Bibliográfica: *Maria Iara Pereira Machado*

Editoração eletrônica: *Maria da Graça S. P. Negrão*

### **1ª edição**

1ª impressão (2005):

E 92 Evolução molecular in vitro: seleção de moléculas inseticidas para insetos-praga do algodoeiro / Maria Cristina Mattar da Silva ... [et. al.]. – Brasília, DF : Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005.

22.p. - (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ISSN 1676-1340 ; 99)

1. Algodão. 3. Inseticidas. 4. Pragas. I. Brunetta, Patrícia S. F. II. Figueira, Edson L. Z. III. Magalhães, Mariana T. Q. IV. Oliveira, Gustavo R. V. Ramos, Hudson B. VI. Del Sarto, Rafael P. VII. Cruz, Cleiton M. VIII. Oliveira, Raquel S. IX. Cavalcanti, Keline, L. X. Craveiro, Kilvia. XI. Barbosa, Aulus E. A. D. XII. Paes, Norma S. XIII. Rocha, Thales L. XIV. Teixeira, Fabíola R. XV. Coutinho, Marise V. XVI. Grossi-de-Sá, Maria de Fátima. XVII. Título. XVIII. Série.

632.951 – CDD 21

## SUMÁRIO

RESUMO .....	6
ABSTRACT .....	8
INTRODUÇÃO .....	9
OBJETIVO.....	10
MATERIAL E MÉTODOS.....	11
1. DNA Shuffling .....	11
1.1. Etapas para a construção das bibliotecas utilizando os genes cry e genes para inibidores de $\alpha$ -amilases.....	11
2. Construções das bibliotecas combinatórias.....	12
3. Seleção das formas ligantes a proteínas específicas (Phage display) .....	13
3.1 Seleção dos variantes de genes cry .....	13
3.2 Seleção de variantes para $\alpha$ Als .....	13
4. Análise das sequências nucleotídicas.....	13
5. Bioensaios.....	14
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	14
1- Biblioteca de variantes de genes cry.....	14
2 - Construções de bibliotecas combinatórias de genes cry e seleção de variantes	15
3- Construção de bibliotecas combinatórias de gene de $\alpha$ -AI-1 e $\alpha$ -AI-2 e seleção de variantes .....	18
CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....	19
REFERÊNCIAS .....	20

# EVOLUÇÃO MOLECULAR *IN VITRO*: SELEÇÃO DE MOLÉCULAS INSETICIDAS PARA INSETOS-PRAGA DO ALGODOEIRO

---

**M. Cristina Mattar da Silva<sup>1</sup>**

**Patrícia S. F. Brunetta<sup>2</sup>**

**Edson L. Z. Figueira<sup>3</sup>**

**Mariana T. Q. Magalhães<sup>4</sup>**

**Gustavo R. Oliveira<sup>5</sup>**

**Hudson B. Ramos<sup>6</sup>**

**Rafael P. del Sarto<sup>7</sup>**

**Cleiton M. Cruz<sup>8</sup>**

**Raquel S. Oliveira<sup>9</sup>**

**Keline L. Cavalcanti<sup>10</sup>**

**Kilvia Craveiro<sup>11</sup>**

**Aulus E. A. D. Barbosa<sup>12</sup>**

**Norma S. Paes<sup>13</sup>**

**Thales L. Rocha<sup>14</sup>**

**Fabiola, R. Teixeira<sup>15</sup>**

**Marise V. Coutinho<sup>16</sup>**

**Maria Fátima Grossi-de-Sá<sup>17</sup>**

---

<sup>1</sup> Bióloga – PhD – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

<sup>2</sup> Eng<sup>a</sup>. Agr<sup>a</sup>. – Doutoranda em Ciências Genômicas e Biotecnologia – Universidade Católica de Brasília – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

<sup>3</sup> Farmacêutico – PhD – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

<sup>4</sup> Eng<sup>a</sup>. Agr<sup>a</sup>.- Mestranda em Biologia Molecular – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

<sup>5</sup> Biólogo – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

<sup>6</sup> Químico – Graduando – Universidade de Brasília - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

<sup>7</sup> Biólogo – Mestrando em Biologia Molecular – Universidade de Brasília - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

<sup>8</sup> Biólogo – Graduando- Faculdade da Terra de Brasília - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

<sup>9</sup> Bióloga – Mestranda em Ciências Genômicas e Biotecnologia – Universidade Católica de Brasília - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

<sup>10</sup> Bióloga - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

<sup>11</sup> Bióloga – Doutoranda em Biologia Molecular – Universidade de Brasília – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

<sup>12</sup> Biólogo, Doutorando – Universidade Católica – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

<sup>13</sup> Bióloga – Msc em Biologia Molecular – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

<sup>14</sup> Biólogo – PhD – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

<sup>15</sup> Graduanda em Biologia- FTB

<sup>16</sup> Eng<sup>a</sup>. Agr<sup>a</sup>. – Msc em Biologia Molecular - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

<sup>17</sup> Biomédica – PhD – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

## RESUMO

O bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis*) e a lagarta do cartucho (*Spodoptera frugiperda*) são insetos que causam perdas significativas para a agricultura devido aos danos causados à cultura do algodão. Estratégias biotecnológicas utilizam proteínas envolvidas com a defesa de plantas, incluindo as  $\delta$ -endotoxinas e os inibidores de  $\alpha$ -amilases ( $\alpha$ Als), como ferramentas no desenvolvimento de plantas resistentes aos insetos-praga. Neste contexto, a estratégia envolvendo a evolução *in vitro* de moléculas, por meio da técnica de *DNA shuffling*, tem sido aplicada para gerar moléculas variantes, com melhor toxicidade e especificidade para insetos-praga. Quatro bibliotecas combinatórias foram construídas utilizando as técnicas de *DNA shuffling* e *Phage display*. Três genes para toxinas Cry (*cry11a12*, *cry3Aa1* e *cry8Ha*), assim como a recombinação dos genes  $\alpha$ AI-1 and  $\alpha$ AI-2, isolados de sementes de *Phaseolus vulgaris*, foram utilizados para a reação de *DNA shuffling*, gerando bibliotecas individualizadas. Cada uma das bibliotecas de variantes de  $\alpha$ Als e de toxinas Cry geraram cerca de  $10^5$ - $10^7$  genes mutantes, que foram selecionados *in vitro* contra as  $\alpha$ -amilases e BBMV intestinal (*Brush Border membrane Vesicles*) dos insetos, *A. grandis* e *S. frugiperda*. Os genes para moléculas variantes foram expressos na superfície de fagos e as proteínas recombinantes foram avaliadas em bioensaios. Os dados obtidos confirmam a eficiência da estratégia na geração de um grande número de moléculas variantes, com atividade e especificidade melhoradas para insetos-praga alvos.

## ABSTRACT

The cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*) and the fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) are insects that cause severe losses to cotton agriculture. In order to control those insect pests, protein related to plant defense, including  $\delta$ -endotoxins and  $\alpha$ -amylases inhibitors ( $\alpha$ Als), has been used. Additionally, *in vitro* molecular evolution strategy has been applied to create variant genes whose protein products have improved toxicity and specificity against those insects. Four combinatorial libraries were constructed using DNA shuffling and Phage Display techniques. Three combinatorial libraries were constructed using the individual genes *cry1Ia12*, *cry3Aa1* and *cry8Ha* isolated from *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) and a further library constructed by homologous recombination of  $\alpha$ AI-1 and  $\alpha$ AI-12 genes isolated from *Phaseolus vulgaris* seeds. All the libraries resulted in a range of  $10^5$ - $10^7$  recombined genes. The  $\alpha$ amylase inhibitors and *cry* gene libraries were selected *in vitro* against *A. grandis*  $\alpha$ -amylases and or BBMV receptors respectively. The results confirm *in vitro* molecular evolution as an efficient strategy to generate large numbers of variant molecules with improved activities and specificities towards insect pests.

## INTRODUÇÃO

A cotonicultura é uma das atividades de grande importância sócio-econômica para o Brasil na atualidade, ocupando 1.151,8 mil hectares de área cultivada no ano agrícola 2004/2005, dentre os quais 631 mil na região Centro-Oeste (COMPANHIA..., 2005). A primeira ocorrência do bicudo do algodoeiro em território nacional foi registrada no ano de 1983, quando uma área recorde de algodão herbáceo (2.200.000 de hectares) foi plantada. Posteriormente, observou-se uma diminuição progressiva na área cultivada, provocada principalmente pelas dificuldades no controle desta praga, que apresenta hábito de crescimento endofítico e altos índices de danos econômicos. Na safra 1996/1997, o Brasil registrou seu pior desempenho em termos de área cultivada, tendo plantado nesse período apenas 600 mil hectares (COMPANHIA..., 2005). A partir de então, houve uma recuperação gradativa da cotonicultura, motivada pela conjunção de três fatores: a migração da cultura para a região Centro-Oeste; a reorganização do setor, ocorrida no final dos anos 90; e a melhoria da qualidade da fibra produzida.

No entanto, o cultivo sucessivo do algodão em grandes áreas favorece o ataque de insetos-praga, que incluem o bicudo do algodoeiro, o curuquerê (*Alabama argilacea*), a lagarta do cartucho do milho (*Spodoptera frugiperda*), a lagarta da maçã (*Heliothis virescens*) e a lagarta rosada (*Pectinophora gossypiella*), que encontram nas folhas, flores e botões florais substâncias açucaradas excretadas por glândulas denominadas de nectários, tornando, dessa forma, a cultura muito atrativa para os insetos-praga.

O bicudo do algodoeiro é considerado uma das pragas de maior relevância na cotonicultura mundial, devido aos danos causados e às dificuldades de controle pelos métodos convencionais. Destacam-se também os problemas relacionados à lagarta do cartucho do milho, que se alimenta das folhas em seu estágio larval, penetrando nas maçãs e nos botões florais, o que dificulta o seu controle e compromete a qualidade e a quantidade de fibra produzida. O controle químico desses insetos requer a aplicação de grande quantidade de inseticida, além de apresentar uma eficiência relativamente baixa, em decorrência da dificuldade de acesso aos insetos, que apresentam hábito endofítico.

Tendo em vista os prejuízos causados pelos insetos-praga e a necessidade de preservação da saúde humana e do meio ambiente, o uso de plantas geneticamente modificadas (GM) vem se consolidando no mundo como uma promissora ferramenta nos programas de melhoramento genético vegetal. A prova disso é que, no ano de 2004, a área total cultivada com as culturas GM atingiu a marca dos 81 milhões de hectares, crescimento significativo (47 vezes) se comparado com os 1,7 milhões de hectares

plantados em 1996 (JAMES, 2004). Do total da área mundial cultivada com as culturas GM, 34% foram cultivados em países em desenvolvimento. A crescente adoção desta tecnologia é reflexo dos benefícios diretos, que incluem a melhoria substancial da produtividade, proteção do meio ambiente, fortalecimento da economia, redução dos riscos, tanto para a saúde dos pequenos e grandes agricultores como para consumidores e para a sociedade em geral.

Genes para proteínas com potencial bioinseticida, incluindo as toxinas Cry do *Bacillus thuringiensis* (*B.t.*) e os inibidores de enzimas hidrolíticas (inibidores de  $\alpha$ -amilases -  $\alpha$ Als e proteinases) são moléculas alvos em estratégias biotecnológicas aplicadas na obtenção de plantas GM com resistência a insetos-praga (CARLINI e GROSSI-DE-SÁ, 2002). Para alcançar melhorias de potenciais benefícios comerciais, uma das alternativas é a utilização da estratégia envolvendo a evolução *in vitro* de moléculas, aplicando-se a técnica de *DNA Shuffling*. Esta técnica promove a recombinação *in vitro* do DNA e foi desenvolvida para gerar genes variantes (mutantes) que codifiquem proteínas com função nova ou melhorada (STEMMER ET AL., 1994; ZHAO e ARNOLD, 1997). Trata-se de um processo que envolve diferentes etapas, a partir da digestão enzimática dos genes e produção de pequenos fragmentos de DNA. Os fragmentos são hibridizados randomicamente, gerando fragmentos maiores que dão origem a genes recombinados (mutantes), por meio da amplificação por PCR (Polymerase Chain Reaction). A aplicação da técnica resulta em um conjunto de genes mutantes, que podem ser traduzidos em novas proteínas de acordo com um propósito específico, como, por exemplo, para o controle de insetos-praga de culturas de importância agrônômica. Genes para moléculas variantes podem ser submetidos a novos ciclos de *shuffling* e seleção, a fim de gerar um maior número de mutações, potencializando, assim, a atividade da proteína. Embora a reunião de múltiplas mutações de interesse em um único gene possa demandar vários ciclos de *DNA shuffling*, este processo é significativamente mais rápido do que o processo de mutações e recombinações, associados à seleção natural, para a fixação de uma nova característica de interesse que ocorre na natureza.

## **OBJETIVO**

Construir bibliotecas de genes para variantes de proteínas entomotóxicas, utilizando as técnicas de *DNA shuffling* e selecionar biomoléculas com atividade sobre os

insetos-praga do algodoeiro, *A. grandis* e *S. frugiperda*, visando sua aplicação no desenvolvimento de plantas GM resistentes a estes insetos-praga.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1 - DNA Shuffling

Na construção das bibliotecas de genes *cry* e de inibidores de  $\alpha$ -amilases foram utilizados os genes descritos na tabela 1.

Fonte	Origem	Genes	Referências
Microorganismo	<i>B. thuringiensis</i> (Bt)	<i>cry11a12</i> <i>cry8Ha1</i> <i>cry3Aa1</i>	Magalhães, M.T.Q., et al 2002, 2004 Magalhães, M.T.Q., et al 2001 Bacillus Genetic Stock Center-EUA
Vegetal	<i>P. vulgaris</i> (Feijão comum)	$\alpha$ -A11e $\alpha$ -A12	Ishimoto et al, 1996; Grossi-de-Sá, et al, 1997

**Tabela 1. Genes utilizados na construção das bibliotecas para obtenção de moléculas variantes.**

O gene *cry8Ha* foi isolado de uma estirpe de *B. thuringiensis*, denominada S811, cuja toxina codificada apresenta atividade para o bicudo do algodoeiro ( $LC_{50} = 180 \mu\text{g/mL}$ ). O gene *cry11a12* foi isolado da mesma estirpe, cuja toxina Cry apresenta atividade contra *A. grandis* ( $LC_{50} = 230 \mu\text{g/mL}$ ) e *S. frugiperda* ( $LC_{50} = 5 \mu\text{g/mL}$ ). O gene *cry3Aa* foi doado pelo Bacillus Genetic Stock Center-EUA, e a toxina expressa não apresenta atividade significativa para nenhum dos dois insetos. Os genes  $\alpha$ -A1-1 e  $\alpha$ -A1-2 foram isolados de sementes de *P. vulgaris*, codificam para inibidores de  $\alpha$ -amilases, os quais apresentam diferentes especificidades para insetos-praga de grãos armazenados.

#### 1.1 - Etapas para a construção das bibliotecas utilizando os genes *cry* e genes para inibidores de $\alpha$ -amilases

##### Etapa 1 (Digestão enzimática)

Genes *Cry*: 10  $\mu\text{g}$  de DNA foram dissolvidos em 80  $\mu\text{l}$  de tampão de *DNase* I (Tris 50 mM, pH 7,5, contendo 1 mM de  $\text{MnCl}_2$  e 0,1 mg/mL de albumina de soro bovino), com a adição de 0,04 unidades da enzima *DNase* I (Invitrogen, 124.5 U/ $\mu\text{L}$ ). A reação ocorreu a 15°C, sendo interrompida após 15 minutos com a adição de 250 mM de EDTA. A fragmentação total do gene foi confirmada em gel de agarose 2,5%. Os fragmentos

contendo tamanhos variados foram purificados em coluna (*PCR purification Kit* - QIAGEN) ou extraídos diretamente do gel de agarose.

Genes  $\alpha$ -AI:  $\alpha$ -AI-1 e  $\alpha$ -AI-2 foram misturados na proporção de 1:1 resultando num total de 10  $\mu$ g. A mistura liofilizada dos DNAs foi dissolvida em 80  $\mu$ l de tampão DNase I e digerida com 0,03 unidades de DNase I a 15°C, por 15 minutos. A interrupção da reação e a purificação dos fragmentos ocorreram como descrito para os genes *cry*.

### **Etapa 2 (Recombinação de fragmentos)**

Foram adicionados 10  $\mu$ L do produto da digestão (etapa 1) a 25  $\mu$ L de uma reação de PCR contendo tampão da polimerase Taq Platinum Pfx 1X (Invitrogen), 0,4 mM de dNTPs e 0,1 U de Taq Platinum Pfx. A reação foi realizada em termociclador (Eppendorf, Mastercycler gradient) programado para 42 ciclos, com uma etapa inicial de 2 min a 95°C. Cada ciclo foi constituído de 1 min a 95 °C, 1 min a 42 °C, 1 min + 5 s/ciclo a 72 °C e 7 min de extensão final a 72 °C.

### **Etapa 3 (Amplificação dos variantes)**

Os fragmentos de tamanhos variados (recombinados na etapa 2) foram utilizados como molde na reação de amplificação. Foram adicionados 1,5  $\mu$ L do produto da reação da etapa 2, para 100  $\mu$ L de uma reação de PCR contendo tampão de Platinum Taq DNA polimerase High Fidelity (Invitrogen) 1x, 0,2 mM de cada dNTP, 2,5 U de cada uma das enzimas: Taq DNA polimerase (Invitrogen) e Platinum Taq DNA polimerase High Fidelity (Invitrogen) e 0,8  $\mu$ M de cada oligonucleotídeo específicos. A reação foi realizada em 24 ciclos, com etapa inicial de 2 min a 95 °C. Cada ciclo foi constituído de 30 s a 95 °C, 30 s a 42°C, 45 s a 72 °C, 14 ciclos adicionais de 30 s a 95 °C, 30 s a 42°C e 45 s a 20 s/ciclo a 72 °C e 7 min a 72 °C. As reações de recombinação dos fragmentos e amplificação dos genes de  $\alpha$ -AI1 e  $\alpha$ -AI2 variantes seguiram as mesmas condições empregadas para os genes *cry*, com exceção da etapa de anelamento, que ocorreu a 55°C. As reações resultaram em genes variantes contendo o mesmo tamanho dos genes originais.

## **2 - Construções das bibliotecas combinatórias**

Os produtos da etapa 3 foram digeridos com enzima *Sfi*I e inseridos no fagomídeo pCOMB3XSS (RADER et. al., 2001), contendo extremidades também franqueadas em *Sfi*I. As células de *E. coli* XL1-Blue foram transformadas com estas construções e infectadas com o fago auxiliar VCSM13 ( $10^{11}$  pfu/mL). Quatro bibliotecas

combinatórias foram expressas na superfície de fagos, segundo o procedimento descrito por Barbas et al. (2001).

### **3 - Seleção das formas ligantes a proteínas específicas (*Phage display*)**

#### **3.1 Seleção dos variantes de genes cry**

A seleção foi realizada com base na afinidade destas toxinas por proteínas (receptores) existentes nas BBMV (*Brush Border Membrane Vesicles*) do intestino dos insetos. As BBMVs foram extraídas do intestino de *A. grandis* e *S. frugiperda* segundo Biber et al. (1981). Utilizou-se 100 µg de BBMV para absorção em dois poços de uma placa de microtitulação a qual foi incubada durante 16 horas a 4°C e 1h a 37°C. Os poços sensibilizados com estas proteínas foram bloqueados com o uso de BSA 3% e incubados 1h a 37°C. A solução de bloqueio foi descartada e o cultivo de fagos contendo formas variantes de toxina Cry na superfície foi imediatamente adicionado. Após uma incubação de 2 horas a 37°C, os poços foram submetidos a um crescente número de lavagens usando PBS-Tween 0,1%, para a eliminação das formas inespecíficas, permanecendo aderidas ao alvo apenas as formas que apresentaram alta afinidade. As formas variantes com afinidade pelas BBMV foram liberadas em condições de pH ácido, re-amplificadas e submetidas a novos ciclos de seleção até a ocorrência do enriquecimento da biblioteca. O enriquecimento de fagos específicos foi identificado pelo aumento crescente do título de saída após cada ciclo de seleção. Este enriquecimento foi confirmado com o teste Fago-Elisa, usando anticorpo anti-M13, (BARBAS III et al., 2001).

#### **3.2 Seleção de variantes para $\alpha$ Als**

Os genes da biblioteca combinatória de variantes para  $\alpha$ Als foram selecionados de acordo com a afinidade pelas  $\alpha$ -amilases extraídas do intestino das larvas do bicudo (DEL SARTO et al., 2004). Dois poços de uma placa de ELISA foram sensibilizados com 50 µg da enzima cujo procedimento de seleção ocorreu como descrito no item 3.1.

### **4. Análise das sequências nucleotídicas**

As sequências dos novos genes para as diferentes variantes foram alinhadas com as sequências dos genes originais utilizando programa ClustalW (HIGGINS et al., 1994). A tradução das sequências nucleotídicas foi realizada pelo programa Translate (<http://bimas.dcr.t.nih.gov/molbio/translate/>). Os alinhamentos possibilitaram a identificação de mutações reais e mutações silenciosas.

## 5. Bioensaios

Os genes selecionados das bibliotecas para toxinas Cry foram expressos em fagos e avaliados em bioensaios. As proteínas recombinantes, obtidas da expressão, foram incorporadas na dieta artificial de *A. grandis*, segundo Praça et al. (2003). Os bioensaios foram realizados em placas de 6 poços contendo 5mL de dieta artificial esterilizada. As placas foram incubadas por sete dias a 28°C com umidade entre 55-60%. Após este período de incubação, contou-se o número de larvas vivas e mortas.

Para testar a atividade das proteínas expressas contra *S. frugiperda* foram utilizadas 480 larvas, segundo o protocolo descrito por Praça et al. (2003). As larvas foram incubadas a 28°C, com umidade relativa variando entre 60-80%. Após dois dias de incubação, as larvas receberam uma nova dieta, contendo a mesma formulação. Posteriormente, as larvas foram avaliadas a fim de se determinar a taxa de mortalidade.

No caso dos inibidores de  $\alpha$ Als que necessitam de glicosilações e clivagens proteolíticas para serem ativos (PUEYO et al., 1993; YOUNG et al., 1999), após a seleção, cada gene mutante foi expresso em plantas de *Arabidopsis*. A atividade e especificidade para os insetos-praga do algodão serão testadas utilizando a determinação de atividade inibitória *in vitro* e *in vivo*, partindo do extrato protéico de plantas de *Arabidopsis thaliana* (experimento em andamento).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1- Biblioteca de variantes de genes *cry*

Objetivando a identificação de biomoléculas com atividade contra os insetos *A. grandis* e *S. frugiperda*, a cepa S811 (*Bt* -Embrapa), que apresenta elevado potencial inseticida, foi utilizada para a clonagem dos dois genes, denominados *cry8Ha1* e *cry1Ia12*. O gene *cry8Ha1* foi isolado pela técnica de Tail-PCR (LIU e WHITTIER, 1995), apresentando 60% de similaridade com as outras toxinas Cry8, presentes no banco de dados, enquanto que o gene *cry1Ia12* foi isolado por meio de PCR com o uso de *primers* específicos, apresentando 99% de similaridade com as outras toxinas Cry1Ia do banco de dados (MAGALHÃES et al., 2004a,b). Ambos os genes foram expressos em sistema heterólogo, *Escherichia coli*, utilizando o vetor de expressão pET101-D/TOPO. As proteínas recombinantes foram purificadas em coluna de Ni-NTA e suas atividades foram testadas em bioensaios seletivos contra as larvas dos insetos *A. grandis* e *S. frugiperda*, segundo protocolo descrito por Praça et al. (2003). (tabela 2).

O gene para a toxina Cry3Aa1, obtido no Bacillus Genetic Stock Center-EUA, foi utilizado devido a sua conhecida atividade entomotóxica contra insetos da ordem

coleóptera. A toxina foi avaliada contra *A. grandis* e nenhuma atividade significativa foi observada (tabela 2).

Proteínas	CL <sub>50</sub>	
	<i>A. grandis</i>	<i>S. frugiperda</i>
Cry8Ha1	180 µg/ml	NA
Cry1Ia12	230 µg/ml	5 µg/ml
Cry3Aa1	NA	NA

**Tabela 2. Atividade inseticida dos genes de *Bt*, utilizados na construção das bibliotecas combinatórias.**

## 2 - Construções de bibliotecas combinatórias de genes *cry* e seleção de variantes

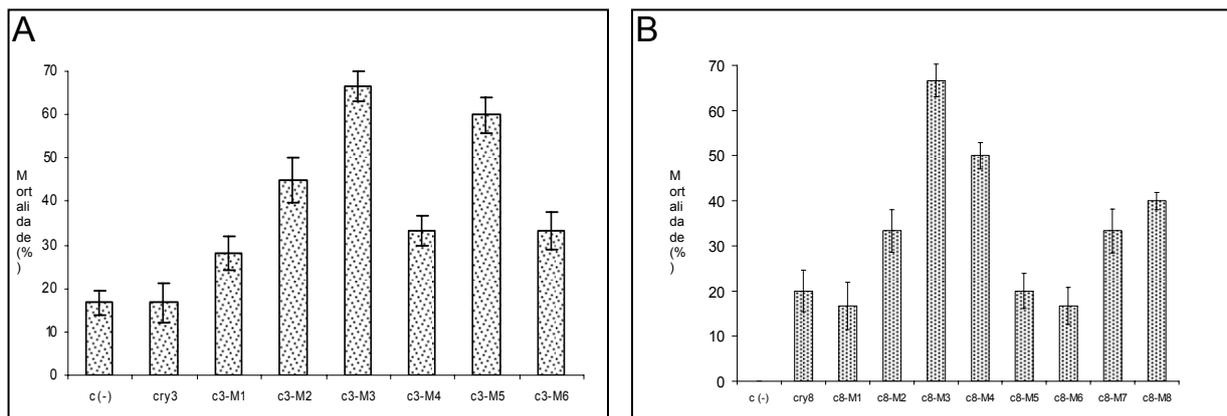
Finalizada a etapa de seleção dos genes a serem empregados, estabeleceu-se três estratégias a serem desenvolvidas na obtenção das bibliotecas combinatórias de genes *cry*, sendo todas geradas pela recombinação dos genes *cry3Aa1* ou *cry8Ha1* ou *cry1Ia12*. Os fragmentos gênicos (30-50pb) de cada uma das bibliotecas foram recombinados como descrito na etapa 2 (Materiais e Métodos), gerando novas variantes que foram inseridas no fagomídeo pCOMB3XSS. As variantes obtidas em cada biblioteca foram da ordem de 10<sup>5</sup> a 10<sup>7</sup> mutantes como descrito na tabela 3.

Biblioteca	No. variantes	No. ciclos seleção	Enriquecimento de fagos(ciclo)		Clones selecionados	
			AG	SF	AG	SF
<i>cry1Ia12</i>	9.30 X 10 <sup>5</sup>	6	5	5	30	30
<i>cry3Aa1</i>	6.83 X 10 <sup>5</sup>	6	3	4	21	16
<i>cry8Ha</i>	1.90 X 10 <sup>7</sup>	6	3	3	30	30

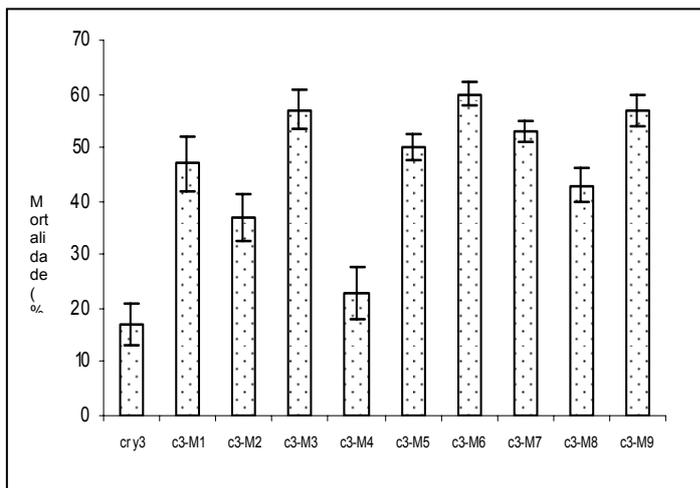
**Tabela 3. Tamanho das bibliotecas combinatórias de genes *cry* e dados da seleção *in vitro* usando proteínas do intestino de *A. grandis* (AG) e *S. frugiperda* (SF).**

As bibliotecas geradas foram utilizadas para selecionar genes para variantes de novas toxinas Cry, variantes com atividade entomotóxica melhorada sobre os insetos, *A. grandis* e *S. frugiperda*. As toxinas selecionadas foram avaliadas em bioensaios contra ambos os insetos, cujos resultados se encontram nas figuras 1 e 2. Tendo como base a quantidade de proteínas expressas pelos fagos, a toxina que apresentou maior atividade foi selecionada da biblioteca para o gene *cry8Ha1*, que apresentou mortalidade de

aproximadamente 70% (c8-M3) contra *S. frugiperda*, indicando aumento de três – quatro vezes na atividade em comparação com a toxina original (Figura 1B). O mesmo resultado foi observado para as toxinas selecionadas da biblioteca de Cry3Aa11, cujas toxinas (c3-M3 e c3-M5) apresentaram de 60 a 70% de mortalidade contra as mesmas larvas (Figura 1A). Nos bioensaios contra as larvas de *A. grandis*, os resultados alcançados, utilizando essa mesma biblioteca, também foram satisfatórios; várias toxinas variantes apresentaram mortalidade superior a 50% (Figura 2). Devido ao baixo nível de expressão das proteínas na superfície dos fagos, as taxas de mortalidade obtidas nos bioensaios podem ser consideradas resultantes de dose subletal das proteínas. Os bioensaios utilizando toxinas selecionadas da biblioteca *cry8Ha* com atividade para *A. grandis* e toxinas selecionadas da biblioteca *cry11a12* com atividade para ambos os insetos foram conduzidos da mesma forma e serão publicados após a validação estatística dos resultados.



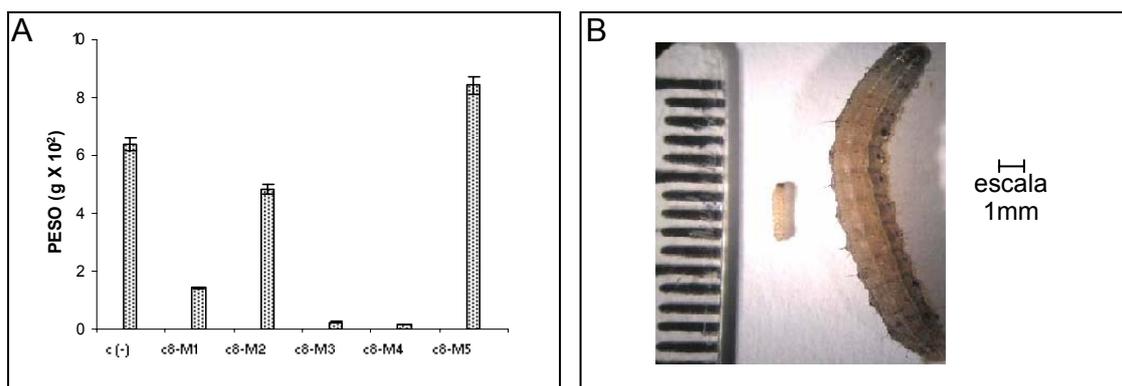
**Figura 1.** Bioensaios seletivos realizados com larvas de *S. frugiperda*., mostrando o nível de mortalidade na presença de toxinas selecionadas das bibliotecas de *cry3Aa1* (A) e *cry8Ha1* (B).



**Figura 2. Bioensaios seletivos realizados com larvas de *A. grandis*, mostrando a mortalidade das larvas na presença de toxinas selecionadas das bibliotecas de *cry3Aa1*.**

Uma vez constatado que o gene *Cry3Aa11* original não apresenta atividade inseticida significativa sobre as larvas de *A. grandis* e *S. frugiperda*, os resultados obtidos indicam que a técnica de *DNA shuffling*, associada à metodologia de seleção *Phage display*, foi bem sucedida na geração de variantes e possibilitou o isolamento de novas moléculas com melhor atividade entomotóxica. Em relação à toxina Cry8, não se pôde determinar com precisão as doses letais ( $CL_{50}$ ), já que os fagos expressam as toxinas em quantidades muito baixas, o que impossibilita uma análise quantitativa dos dados. Dessa forma, o próximo passo será expressar os genes selecionados em um sistema de expressão mais eficiente, que possibilite maior nível de expressão para determinar com maior precisão a taxa de mortalidade dos insetos.

Outra análise importante foi com relação ao tamanho e tempo de desenvolvimento das larvas obtidas nos bioensaios de *S. frugiperda*, em que as poucas larvas sobreviventes mostraram redução de 97% no seu tamanho (Figura 3) quando comparadas com o desenvolvimento das larvas do controle negativo, sem a presença de toxinas. Estes dados indicam que as variantes podem atingir um nível de toxicidade letal, desde que seja ajustada a dosagem de proteína recombinante utilizada no bioensaio (experimento em andamento).



**Figura 3: (A). Peso das larvas de *S. frugiperda* sobreviventes ao ensaio usando expressão de genes selecionados da biblioteca de variantes para toxinas Cry8. (B) Efeito das proteínas recombinantes no desenvolvimento de *S. frugiperda*.**

### **3- Construção de bibliotecas combinatórias de gene de $\alpha$ -AI-1 e $\alpha$ -AI-2 e seleção de variantes**

Uma biblioteca de fagos que expressa formas recombinadas de inibidores de  $\alpha$ -amilase foi construída, utilizando-se os genes  $\alpha$ AI-1 e  $\alpha$ AI-2. Estes inibidores, isolados de sementes de feijão, apresentam diferentes especificidades na ação inibitória das  $\alpha$ -amilases (GROSSI-DE-SÁ et al., 1997; SILVA et al., 2000). Enquanto  $\alpha$ AI-1 inibe a  $\alpha$ -amilase pancreática de porco e as  $\alpha$ -amilases dos bruquídeos *Callosobruchus maculatus* e *Callosobruchus chinensis*, o  $\alpha$ AI-2 inibe especificamente a  $\alpha$ -amilase do bruquídeo *Zabrotes subfasciatus*, mas não inibe a  $\alpha$ -amilase do bicudo do algodoeiro.

Os genes foram recombinados a fim de desenvolver e selecionar moléculas com atividade sobre a enzima de *A. grandis*. Os novos genes introduzidos no fagomídeo pCOMB3XSS geraram uma biblioteca combinatória com  $3,7 \times 10^7$  transformantes. Vinte e sete clones foram seqüenciados e as análises indicaram 22 formas variantes, apresentando, cada uma delas, diferente padrão de recombinação. Os inibidores  $\alpha$ -AI1 e  $\alpha$ -AI2 possuem 56 resíduos de aminoácidos não conservados em posições também identificadas nos mutantes, indicando alta homologia. As seqüências dos mutantes, exibidos na representação esquemática (Figura 4), foram na sua maioria idênticas as do  $\alpha$ -AI1, porém apresentam regiões intercaladas com seqüências do  $\alpha$ -AI2. Análises computacionais utilizando os modelos estruturais dos  $\alpha$ Als variantes (estudo em andamento) propiciarão um melhor entendimento sobre os efeitos das mutações na atividade inibitória.

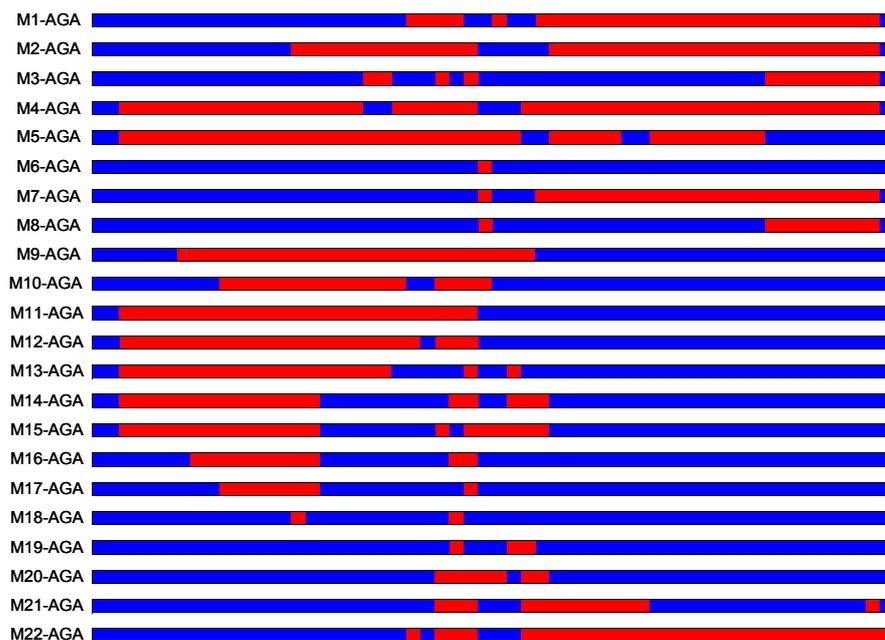


Figura 4: Representação esquemática do perfil de recombinação das seqüências dos 22 mutantes obtidos da seleção contra  $\alpha$ -amilase de *A. grandis*. As regiões em azul referem-se às seqüências do  $\alpha$ -AI-1, o vermelho representa seqüências do  $\alpha$ -AI- 2.

As variantes previamente selecionadas foram subclonadas no vetor pCAMBIA 2300 sob o controle do promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor duplicado (CaMV35Sd) e do *enhancer* do vírus do mosaico da alfafa (AMV). Estas construções estão sendo usadas para inserção dos genes mutantes gerados pela tecnologia de DNA *shuffling* em plantas de *Arabidopsis thaliana*, via *Agrobacterium*. A atividade inibitória destas moléculas variantes será posteriormente avaliada contra  $\alpha$ -amilases de *A. grandis*, afim de identificar os inibidores com maior potencial de utilização em plantas de algodão GM.

## CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Os resultados apresentados neste trabalho reforçam a estratégia de combinação das tecnologias de *DNA shuffling* e *Phage display* para a geração de uma grande quantidade de variantes e seleção de genes codificadores de proteínas e enzimas com atividade melhorada. Essas metodologias podem ser aplicadas como alternativa na busca de soluções de problemas específicos, como, por exemplo, aqueles relacionados aos mecanismos de ação das moléculas envolvidas no processo de resistência aos insetos-praga.

As bibliotecas combinatórias aqui apresentadas permitiram a seleção de vários genes quiméricos com distinta afinidade para as  $\alpha$ -amilases e receptores do intestino de larvas de *A. grandis* e *S. frugiperda*. Seguindo a metodologia de evolução molecular, os genes variantes selecionados a partir do primeiro ciclo de *DNA shuffling* estão sendo submetidos a novos ciclos de recombinação e seleção.

Os efeitos das mutações na estrutura-função das moléculas variantes selecionadas serão explicados nas análises de modelos tridimensionais construídos por meio de técnicas de modelagem molecular, utilizando as coordenadas atômicas de estruturas de cristal ou modeladas das moléculas parentais.

As proteínas variantes que mostraram atividade tóxica ou inibitória *in vivo* serão extensivamente caracterizadas e consideradas no desenho de construções gênicas piramidais para aplicação no programa de melhoramento do algodão quanto à resistência a pragas.

## Referências

BARBAS III, C. F.; BURTON, D. R.; SCOTT, J. K.; SILVERMAN, G. J. Selection from Antibody libraries. In: **Phage Display – A Laboratory Manual – USA**: Cold Spring Laboratory, 2001. p. 10.1-10.20.

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.

CARLINI, C. R.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities of bioinsecticides. **Toxicon**, Elmsford, New York, USA, v. 40, n. 11, p. 1515-1539, 2002.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). Disponível em: < <http://www.conab.gov.br> > . Acesso em: out. 2005.

DEL SARTO, R. P. **Seleção de Genes para inibidores de  $\alpha$ -amilases com potencial uso no controle do bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis*)**. 2004. 27p. Monografia (Graduação) – Faculdade da Terra de Brasília, Brasília.

GROSSI-DE-SÁ, M. F.; CHRISPHEELS, J. M. Molecular Cloning of Bruchid (*Zabrotes subfasciatus*)  $\alpha$ -amylase cDNA and Interactions of the Expressed Enzyme with Bean Amylase Inhibitors. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v.27, p. 271-281, 1997.

HIGGINS, D.; THOMPSON, J.; GIBSON, T.; 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**, Oxford, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

ISHIMOTO, M.; CHRISPPEELS, M. J. Protective mechanisms of the Mexican bean weevil against high levels of a  $\alpha$ -amylase inhibitor in the common bean: *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiology**, Menneapolis, v. 111, p. 393-401, 1996.

JAMES, C. **Global Status of Commercialized Transgenic Crops**: 2004. Ithaca, New York: ISAAA Briefs, 2004.

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**, San Diego, v. 25, p. 674-681, 1995.

MAGALHÃES, M. T. Q.; BATISTA, J. A. N.; FRAGOSO, R. R.; SILVA, S. M. B.; OLIVEIRA, G. R.; OLIVEIRA-NETO, O. B.; FIGUEIRA, E. L. Z.; MONNERAT, R. G.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Isolamento de genes *Bacillus thuringiensis* com potencial uso no controle das pragas do algodoeiro. In: WORKSHOP DE INTERAÇÃO MOLECULAR PLANTAS-PRAGA, 1., 2004, Brasília. **Anais...** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004b. p.37-41.

MAGALHÃES, M. T. Q.; BATISTA, J. A. N.; OLIVEIRA, G. R.; SILVA, S. M. B.; FRAGOSO, R. R.; OLIVEIRA-NETO, O. B.; FIGUEIRA, E. L. Z.; MONNERAT, R. G.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Isolamento de genes *cry* com potencial uso no controle do bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis*). In: ENCONTRO DO TALENTO ESTUDANTIL, 9., 2004. Brasília. **Anais...** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004a. p. 67.

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 bioquímica e clonagem de genes *cry* de uma estirpe de *Bacillus thuringiensis* efetiva contra o bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis*). In: ENCONTRO DO TALENTO ESTUDANTIL, 7., 2002, Brasília. **Anais...** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2002. p. 34.

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 genes de estirpes de *Bacillus thuringiensis* ativas contra o bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis*). In: ENCONTRO DO TALENTO ESTUDANTIL, 6., 2001, Brasília. **Anais...** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. p. 31.

PRAÇA, L. B.; BATISTA, A. C.; MARTINS, E. S.; SIQUEIRA, C. B.; DIAS, D. G. S.; GOMES, A. C. M.; FALCÃO, R.; MONNERAT, R. G. **Prospecção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos da ordem lepidóptera, coleóptera e díptera**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos genéticos e Biotecnologia; 1676-1340; 41)

PUEYO, J. J.; HUNT, D. C.; CHRISPPEELS, M. J. Activation of bean (*Phaseoulus vulgaris*)  $\alpha$ -amylase inhibitor requires proteolytic processing of the proprotein. **Plant Physiology**, Minneapolis, v.101, p. 1341-1348, 1993.

RADER, C.; STEINBERG, P.; BARBAS III, C. F. Selection from antibody libraries. In **Phage Display – A Laboratory Manual – USA**: Cold Spring Laboratory, 2001. p. 10.1-10.9.

SILVA, M. C. M.; GROSSI-DE-SÁ, M. F.; CHRISPPEELS, M. J.; TOGAWA, R. C.; NESHICH, G. Analysis of structural and physico-chemical parameters involved in the

specificity of binding between  $\alpha$ -amylases and their inhibitors. **Protein Engineering**, Oxford, v.13, p. 167-177, 2000.

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

TRANSLATE PROGRAM. Disponível em: < <http://bimas.dcrn.nih.gov/molbio/translate/> >. Acesso em: jul. 2005.

YOUNG, N. M.; THIBAUT, P.; WATSON, D. C.; CHRISPPEELS, M. J. Post-translational processing of two  $\alpha$ -amylase inhibitors and an arcelin from the common bean, *Phaseolus vulgaris*. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 446, p.203-206, 1999.

ZHAO, H.; ARNOLD, F. H. Functional and nonfunctional mutations distinguished by random recombination of homologous genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 94, p. 7997-8000., 1997.