

ISSN 0102 0110
Outubro, 2007

**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

Documentos 229

**II WORKSHOP INTERAÇÃO
MOLECULAR PLANTA PRAGAS**

EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA

Coordenadora-Geral

Maria Fátima Grossi de Sá

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Brasília, DF
2007

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) 448-4600 Fax: (61) 340-3624

<http://www.cenargen.embrapa.br>

e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Sergio Mauro Folle*

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

Membros: *Arthur da Silva Mariante*

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*

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

Capa: Liziane Maria de Lima

Revisão ortográfica: José Cesamildo Cruz Magalhães

1ª edição

1ª impressão (2007):

Todos os direitos reservados

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

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

W 927 Workshop Interação Molecular Planta-Pragas (2.: 2007: Brasília, DF)

II Workshop Interação Molecular Planta-Pragas : Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia / editado por Maria Fátima Grossi de Sá ... [et al.]. -- Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007.

150 p. -- (Documentos / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 0102 - 0110; 229).

1. Planta-praga - interação molecular. 2. Workshop. 3. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. I. Sá, Maria Fátima Grossi de. II. Série.

632 - CDD 21.

Editores

Maria Fátima Grossi de Sá (Coordenação Geral)
Maria Cristina Mattar da Silva (Vice-coordenação)
Alexandre Augusto Pereira Firmino
Osmundo Brilhante de Oliveira Neto
Thales Lima Rocha
Arnúbio Valencia
Érico Augusto Rosas de Vasconcelos

**Programa
e
Resumos Expandidos**

14-15 de Junho de 2007

BRASÍLIA – DF

COMISSÃO ORGANIZADORA

Maria Fátima Grossi de Sá (Coordenação Geral)
Maria Cristina Mattar da Silva (Vice-coordenação)
Alexandre Augusto Pereira Firmino
Osmundo Brilhante de Oliveira Neto
Thales Lima Rocha
Arnúbio Valencia
Érico Augusto Rosas de Vasconcelos

APRESENTAÇÃO

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

Em sua segunda edição, o evento tem como objetivo específico a apresentação dos projetos de pesquisa em desenvolvimento no LIMPP, bem como trabalhos de colaboradores em outros laboratórios e instituições que, com o LIMPP, desenvolvem projetos em parceria. A experiência do primeiro workshop, realizado em 2004, mostrou a importância deste tipo de evento na interação entre equipes de pesquisa (pesquisadores, estudantes de graduação e pós-graduação) e convidados especiais, por meio da discussão de resultados experimentais, levantamento de perspectivas e estabelecimento de novas parcerias.

Neste segundo workshop, além dos projetos desenvolvidos na área de genômica e transformação de plantas, apresentamos projetos e resultados na área de Proteômica, uma nova abordagem utilizada no LIMPP e inserida nos principais projetos do laboratório: Estratégias moleculares aplicadas à prospecção de genes envolvidos com a resistência de plantas ao parasitismo de fitonematóides; e Estratégias moleculares aplicadas à prospecção de genes visando o controle de insetos-praga.

Gostaríamos de parabenizar e agradecer a todos os participantes deste segundo workshop, especialmente a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e demais instituições, pelo apoio recebido.

Apoio: EMBRAPA, UCB, UnB, UFRGS, CNPq, CAPES, FACUAL, FIALGO, ICGB, FUNDEAGRO

PROGRAMA

II WORKSHOP DE INTERAÇÃO MOLECULAR PLANTA-PRAGA

14 e 15 de Junho de 2007

Auditório Central

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Quinta-feira, 14 de Junho de 2007

13:30-14:00 - Abertura – Projetos desenvolvidos no Laboratório de Interação Molecular Planta-Praga. **Dra. Maria Fátima Grossi de Sá** – *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*.

SESSÃO I - PROSPECÇÃO DE GENES PARA APLICAÇÃO NO CONTROLE DE PRAGAS

Coordenador: *Maria Cristina Mattar da Silva*

14:00-14:15 – Identificação de dois genes *CRY8* em cepas de *Bacillus thuringiensis* autóctones do estado da Paraíba. **José D. Antônio de Souza** – *Embrapa Algodão*.

14:15-14:30 – Uso potencial do inibidor de α -amilase 0.53 de trigo no controle de Bruchídeos. **Janaína Nascimento** – *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*.

14:30-14:45 – Geração de biblioteca combinatória de genes de defensinas e identificação de variantes com potencial antimicrobiano contra fungos patogênicos de algodoeiro e soja. **Maria Cristina Mattar da Silva** – *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*.

14:45-15:00 – Variantes de inibidores de β -amilases selecionados por *Phage Display* com atividade para β -amilases do bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis*, coleptera: curculionidae). **Rafael Persegini Del Sarto** – *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*.

15:00-15:15 – Novas toxinas Cry8 com atividade entomotóxica para o bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis*) e para a lagarta do cartucho (*Spodoptera frugiperda*). **Gustavo Ramos de Oliveira** – *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*.

15:15-15:30 – Evolução *in vitro* de moléculas: seleção de variantes Cry para insetos-praga do algodão e da cana-de-açúcar. **José Edilson Gomes Júnior** – *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*.

15:30-16:00 – Coffee Break

SESSÃO II - MOLÉCULAS COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO NO CONTROLE DE INSETOS-PRAGAS

Coordenador: Arnúbio Valencia

16:00-16:15 – Prospecção de moléculas de plantas nativas do cerrado com atividade contra o fungo causador da ramulose do algodoeiro. **Aline Melro Murad** – *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*.

16:15-16:30 – Caracterização das inclusões protéicas do *Bacillus thuringiensis* S811: uma cepa eficaz no controle das pragas do algodoeiro. **Mariana Quezado** – *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*.

16:30-16:45 – Caracterização proteômica da cepa S811 de *Bacillus thuringiensis* e avaliação da toxicidade de suas proteínas para *Anthonomus grandis*. **Érico A. Rosas de Vasconcelos** – *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*.

16:45-17:00 – Caracterização parcial de enzimas proteolíticas intestinais de larvas de broca gigante da cana, *Castnia licus* (drury). **Jorge Arboleda** – *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*.

17:00-17:15 – Avaliação de biossegurança alimentar das toxinas Cry11a12 e cry8ha1 em mamíferos. **Luciane Guimarães** – *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*.

17:15-17:30 – Estratégias para identificação e caracterização de receptores do bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis*) para toxinas Cry. **Erich Nakasu** – *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*.

Sexta-feira, 15 de junho de 2007

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

Coordenação: *Osmundo Brilhante de Oliveira Neto*

09:00-09:20 – Efeito das citocininas no superbrotamento do algodoeiro. **Julita M. F. C. Carvalho** – *Embrapa Algodão*.

09:20-09:40 – Propagação *in vitro* do algodão via embriogênese somática. **Julita M. F. C. Carvalho** – *Embrapa Algodão*.

09:40-10:00 – Embriogênese somática do algodoeiro (*Gossypium hirsutum*). **Isabela Evangelista** – *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*.

10:00-10:20 – Caracterização funcional de novos promotores isolados de soja e algodão. **Luciane Guimarães** – *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*.

10:20-10:35 – **Coffee Break**

10:35-10:55 – Construção de vetores para transformação genética do algodoeiro visando resistência a insetos-praga. **Isabela Lourenço** - *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*.

10:55-11:15 – Transformação genética de plantas de algodão via tubo polínico com o gene *cry11a12* visando resistência a insetos-praga. **Paulo Henrique Costa** – *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*.

11:15-11:35 – Transformação genética de *Coffea arabica* para o controle da broca-do-café (*Hypothenemus hampei*). **Aulus Barbosa** – *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*.

SESSÃO IV - ESTRATÉGIAS DE GENÔMICA FUNCIONAL E PROTEÔMICA

Coordenação: *Thales Lima Rocha*

14:00-14:15 – Análise proteômica comparativa de diferentes fases de desenvolvimento de *Meloidogyne incógnita*. **Erivaldo Casado-Filho** – *Universidade Católica de Brasília*.

14:15-14:30 – Análise proteômica de raízes de algodoeiro resistente e susceptível infectadas com *Meloidogyne incógnita*. **Thales Lima Rocha** – *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*.

14:30-14:45 – Análise histopatológica e da expressão diferencial de seqüências potencialmente associadas ao mecanismo de resistência de *Arachis silvestre* a *Meloidogyne arenaria*, raça 1. **Karina Proite** – *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*.

14:45-15:00 – Identificação de genes potencialmente envolvidos na resistência a *Meloidogyne incognita* em feijão e algodão. **Celso Santana** – *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*.

15:00-15:15 – Caracterização de bibliotecas subtrativas de cDNA de genótipos suscetível e resistente de algodão infectados com *Meloidogyne incógnita*. **Patrícia Caetano** – *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*.

15:15-15:30 – **Coffee Break**

15:30-15:45 – Genes de resistência das classes 1 e 2 de *Coffea arabica* relacionados às seqüências da base de dados brasileira de ESTs do Genoma Café. **Érika Albuquerque** – *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*.

15:45-16:00 – Análise *in silico* dos ESTs isolados de *Coffea arabica* infestada com *Meloidogyne paranaensis*. **Érika Albuquerque** – *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*.

16:00-16:15 – Análise de ESTs de raízes de genótipos de algodão contrastantes com resistência e susceptibilidade ao nematóide *Meloidogyne incógnita*. **Aulus Estevão Barbosa** – *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*.

16:15-16:30 – Plantas transgênicas de *Nicotiana tabaccum* expressando dsRNA, conferem resistência a *Meloidogyne incógnita*. **Djair Souza** – *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*.

16:30-16:45 – Construção de uma membrana de macroarranjo de DNA para o estudo da interação planta-nematóide. **Rosângela Vieira** – *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*.

ÍNDICE DOS RESUMOS EXPANDIDOS

SESSÃO I - Prospecção de genes para aplicação no controle de pragas

IDENTIFICAÇÃO DE DOIS GENES <i>cry8</i> EM CEPAS DE <i>Bacillus thuringiensis</i> AUTÓCTONES DO ESTADO DA PARAÍBA. - Antonino-Souza, Jr. J. D.; Jain, S.; Gouveia C. A. P.; Martins, P. G. S.; Ayres, C. F. J; Lucena, W. A.	12
USO POTENCIAL DO INIBIDOR DE α -AMILASE 0.53 DE TRIGO NO CONTROLE DE BRUCHÍDEOS. - Lima, J.N.; Oliveira-Neto, O.B.; Arboleda V.J.W.;Valencia-Jiménez, A; Mulinari, F.; Grossi-de-Sá, M.F.....	16
GERAÇÃO DE BIBLIOTECA COMBINATÓRIA DE GENES DE DEFENSINAS E IDENTIFICAÇÃO DE VARIANTES COM POTENCIAL ANTIMICROBIANO CONTRA FUNGOS PATOGÊNICOS DE ALGODOEIRO E SOJA. - Silva, M.C.M.; Dias, G.C.; Silva, M.S.; Lacerda, A.F.; del Sarto, R. P.; Rocha, T.L.; Oliveira-Neto, O.B.; Coutinho, M.V; Grossi-de-Sá, M.F.	21
VARIANTES DE INIBIDORES DE β -AMILASES SELECIONADOS POR <i>PHAGE DISPLAY</i> COM ATIVIDADE PARA β -AMILASES DO BICUDO DO ALGODOEIRO (<i>Anthonomus grandis</i> , COLEPTERA: CURCULIONIDAE). - Del Sarto, R. P.; Cruz, C.C.M. da; Teixeira, F. R.; Bezerra, I.C.; Silva, M.C.M; Grossi-de-Sá, M.F.....	26
NOVA TOXINA CRY8 COM ATIVIDADE ENTOMOTÓXICA PARA O BICUDO DO ALGODOEIRO (<i>Anthonomus grandis</i>). - Ramos, H.B.; Oliveira, G.R.; Brunetta, P.S.F.; Barbosa, A.E.A.D.; Figueira, E.L.Z.; Silva, M.C.M; Grossi-de-Sá, M.F.	31
ATIVIDADE INSETICIDA DE UMA NOVA PROTEÍNA CRY PARA A LAGARTA DO CARTUCHO (<i>Spodoptera frugiperda</i>). - Oliveira, G.R.; Ramos, H.B.; Brunetta, P.S.F.; Barbosa, A.E.A.D.; Figueira, E.L.Z.; Silva, M.C.M.; Grossi-de-Sá, M.F.	35
EVOLUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE MOLÉCULAS: SELEÇÃO DE VARIANTES CRY PARA INSETOS-PRAGA DO ALGODÃO E DA CANA-DE-AÇÚCAR. - Gomes Júnior, J.E.; Craveiro, K.I.C.; Silva, M.C.M.; Grossi-de-Sá, M.F.	39

SESSÃO II - Moléculas com potencial biotecnológico no controle de insetos-pragas

CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE ENZIMAS PROTEOLÍTICAS INTESTINAIS DE LARVAS DE BROCA GIGANTE DA CANA, <i>Castnia licus</i> (DRURY). - Arboleda V.J.W.; Valencia-Jiménez, A.; Silva, M.S.; Grossi-de-Sá, M.F.	43
CARACTERIZAÇÃO DAS INCLUSÕES PROTÉICAS DO <i>Bacillus thuringiensis</i> S811: UMA CEPA EFICAZ NO CONTROLE DAS PRAGAS DO ALGODOEIRO. - Quezado, M.; Vasconcelos, E.A.R.; Silva, T.S.; Batista, J.A.N.; Oliveira-Neto, O.B.; Grossi-de-Sá, M.F.	49
INFLUÊNCIA DO GRUPAMENTO N-ACIL DAS HOMESERINA-LACTONAS NA SUA LIGAÇÃO COM A HOMOSERINA-LACTONA HIDROLASE DE <i>Bacillus thuringiensis</i> . - Lucena, W.; Lima, L.M.L.; Straatsma, T.P.; Lins, R.D.	56
CARACTERIZAÇÃO PROTEÔMICA DA CEPA S811 DE <i>Bacillus thuringiensis</i> E AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE SUAS PROTEÍNAS PARA <i>Anthonomus grandis</i> . - Vasconcelos, E.A.R.; Silva, T.S.; Magalhães, J.C.C.; Rocha, T.L.; Grossi-de-Sá, M.F.	60
ESTRATÉGIAS PARA IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE RECEPTORES DO BICUDO DO ALGODOEIRO (<i>Anthonomus grandis</i>) PARA TOXINAS CRY. Nakasu, E.Y.T.; Firmino, A.A.P., Dias, S.C., Oliveira, G. R.; Grossi-de-Sá, M.F.	66
AVALIAÇÃO DE BIOSSEGURANÇA ALIMENTAR DAS TOXINAS Cry1Ia12 e Cry8Ha1 EM MAMÍFEROS. - Guimarães, L.M.; Muchagata, R.C.C.; Fragoso, R.R.; Magalhães, M.T.Q.; Grossi-de-Sá, M.F.	71
PROSPECÇÃO DE MOLÉCULAS DE PLANTAS NATIVAS DO CERRADO COM ATIVIDADE CONTRA O FUNGO CAUSADOR DA RAMULOSE DO ALGODOEIRO. - Murad, A.M.; Rocha, T.L.; Silva, M.S.; Espindola, L.S.; Suassuna, N.D.; Charchar, M.J.A.; Anjos, J.R.N.; Grossi-de-Sá, M.F.	75

SESSÃO III - Transformação de plantas com genes de controle a pragas

EFEITO DAS CITOCININAS NO SUPERBROTAMENTO DO ALGODOEIRO. - Carvalho, J.M.F.C.; Pimentel, N.W.; Aires, P.S.R.	79
PROPAGAÇÃO <i>IN VITRO</i> DO AGODÃO VIA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA. - Carvalho, J.M.F.C.; Silva, M.M.de A.; Medeiros, M.J.L.; Souza, D.M.	83
EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DO ALGODOEIRO (<i>Gossypium hirsutum</i>). - Evangelista, I.B.R.; Bodens, F.W.P.; Paula, A.W.M.; Paes, N.S.; Teixeira, J.B.; Grossi-de-Sá, M.F.	86
CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE NOVOS PROMOTORES ISOLADOS DE SOJA E ALGODÃO. - Guimarães, L.M.; Pontes, N.; Viana, A.A.B.; Batista, J.A.N.; Fragoso, R.R.; Grossi-de-Sá, M.F.	91
CONSTRUÇÃO DE VETORES PARA TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DO ALGODOEIRO VISANDO RESISTÊNCIA A INSETOS-PRAGA. - Lourenço, I.T.; Fragoso, R.R.; Rocha, T.L.; Grossi-de-Sá, M.F.	96
TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE PLANTAS DE ALGODÃO VIA TUBO POLÍNICO COM O GENE <i>cry1Ia12</i> VISANDO RESISTÊNCIA A INSETOS-PRAGA. - Costa, P.H.A.; Oliveira-Neto, O.B.; Oliveira, R.S.; Grossi-de-Sá, M.F.	102

TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE *Coffea arabica* PARA O CONTROLE DA BROCA-DO-CAFÉ (*Hypothenemus hampei*) - Barbosa, A.E.A.D.; Barros, E.V.S.A.; Teixeira, J.B.; Grossi-de-Sá, M.F. 105

SESSÃO IV - Estratégias de genômica funcional e proteômica

ANÁLISE PROTEÔMICA COMPARATIVA DE DIFERENTES FASES DE DESENVOLVIMENTO DE <i>Meloidogyne incognita</i> . - Casado-Filho, E.; Rocha, T.L.; Metha, A.; Noronha, E. F.; Grossi-de-Sá, M.F.; Murad, A.M.; Franco, O.L.	109
ANÁLISE PROTEÔMICA DE RAÍZES DE ALGODOEIRO RESISTENTE E SUSCEPTÍVEL INFECTADAS COM <i>Meloidogyne incognita</i> . - Rocha, T.L.; Costa, P.H.A.; Magalhães, J.C.C.; Grossi-de-Sá, M.F.....	113
ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E DA EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE SEQUÊNCIAS POTENCIALMENTE ASSOCIADAS AO MECANISMO DE RESISTÊNCIA DE <i>Arachis</i> SILVESTRE A <i>Meloidogyne arenaria</i> RAÇA1 - Proite, K.; Leal-Bertioli, S.C.; Bertioli, D.; Guimarães, P.M..	119
IDENTIFICAÇÃO DE GENES POTENCIALMENTE ENVOLVIDOS NA RESISTÊNCIA A <i>Meloidogyne incognita</i> EM FEIJÃO E ALGODÃO. - Santana, C.G.; Andrade, A.E.; Guimarães, L.M.; Paes, N.S.; Fragoso, R.R.; da Silva, F.R.; de Oliveira, J.T.A.; Carneiro, R.M.D.; Grossi-de-Sá, M.F.; Metha, A.....	123
CARACTERIZAÇÃO DE BIBLIOTECAS SUBTRATIVAS DE cDNA DE GENÓTIPOS SUSCETÍVEL E RESISTENTE DE ALGODÃO INFECTADOS COM <i>Meloidogyne incognita</i> . - Caetano, P.; Paes, N.S.; da Silva, F.R.; Carneiro, R.M.D.; Grossi-de-Sá, M.F.; Mehta, A; Sales, R.M.O.B... ..	127
SEQUÊNCIAS DE GENES DE RESISTÊNCIA DAS CLASSES 1 E 2 DE <i>Coffea arabica</i> RELACIONADOS AO BANCO BRASILEIRO DE ESTS DE CAFÉ - E.V.S. Albuquerque ^{1*} , M.S. Silva ² , C.C. Teixeira ¹ , N.F. Martins ¹ , M.A. Campos ³ and M.F.Grossi-de-Sá.. ..	130
ANÁLISE <i>in silico</i> DOS ESTs ISOLADOS DE <i>Coffea arabica</i> INFESTADA COM <i>Meloidogyne paranaensis</i> . - Albuquerque, E.V.S.; Silva, M.S.; Teixeira, C.C.; Campos, M.A.; Grossi-de-Sá, M.F.; Da Silva, F.R.....	134
ANÁLISE DE ESTs DE RAÍZES DE GENÓTIPOS DE ALGODÃO CONTRASTANTES COM RESISTÊNCIA E SUSCEPTIBILIDADE AO NEMATÓIDE <i>Meloidogyne incognita</i> - Barbosa, A.E.A.D.; Lima, L.M.; Fragoso, R.R.; Guimarães, L.M.; Souza, D.S.L.; Oliveira Neto, O.B.; Paes, N.S.; Carneiro R.G.; Togawa, R.C.; Martins, N.F; Grossi- de-Sá, M.F.	139
IDENTIFICAÇÃO DE SEQUÊNCIAS EXPRESSAS ETIQUETADAS (ESTs) ENVOLVIDAS NA INTERAÇÃO DE A RROZ E DO FUNGO CAUSADOR DA BRUSONE (<i>Magnaphorte grisea</i>) - Bevitori, R.; Reis, M.S.; Diógenes, R.; Brondani, R.V., Da Silva, F.R.; Paula, A.W.M de; Grossi-de-Sá, M.F.	144
PLANTAS TRANSGÊNICAS DE <i>Nicotiana tabaccum</i> EXPRESSANDO dsRNA QUE CONFERE RESISTÊNCIA A <i>Meloidogyne incognita</i> . - Souza, D.S.L.; Sousa, B.A.; Pires, N.F.; Romano, E.; Rocha, T.L.; Barbosa, A.E.A.D.; Teixeira, F.M.; Martins de Sá, C.; Fragoso, R.R.; Murad, A.M.; Silva, M.C.M.; Grossi-de-Sá, M.F.	147

IDENTIFICAÇÃO DE DOIS GENES *cry8* EM CEPAS DE *Bacillus thuringiensis* AUTÓCTONES DO ESTADO DA PARAÍBA

Antonino-Souza, Jr. J. D.¹; Jain, S.²; Gouveia C. A. P.³; Martins, P. G. S.³; Ayres, C. F. J.⁴; Lucena, W. A.²

¹Departamento de Zoologia, CCB, UFPE; ²Laboratório de Biologia Molecular de Insetos, Embrapa Algodão; ³Departamento de Biologia, CCBS, UEPB; ⁴Departamento de Entomologia, CPqAM/FIOCRUZ.

bioantonino@yahoo.com.br

RESUMO

Cepas de *Bacillus thuringiensis* (Bt) foram isoladas a partir de amostras de solos de diferentes localidades do Estado da Paraíba, coletadas em 7 municípios. As cepas foram submetidas à caracterização molecular e bioquímica. Foram realizados bioensaios com lagartas de *Spodoptera frugiperda* utilizando-se as cepas selecionadas nas caracterizações anteriores. Dois isolados, dentre 171 analisados, apresentaram fragmentos de tamanho esperado, ambos para o par de iniciadores gerais da família *cry1*. Estas cepas não apresentaram toxicidade para *S. frugiperda*. Pela análise da seqüência parcial de nucleotídeos e da seqüência deduzida de aminoácidos dos genes *cry*, um na cepa BV-5 e outro na cepa AN2-3, verificou-se que estes genes têm maior identidade com genes da família *cry8*. Os genes inteiros destas cepas serão caracterizados e as cepas serão testadas contra os principais coleópteros que são pragas no Brasil.

INTRODUÇÃO

O *Bacillus thuringiensis* (Bt) é uma bactéria Gram-positiva que, durante a fase de esporulação, produz um cristal paraesporal, o qual pode conter uma ampla diversidade de toxinas, denominadas Cry e Cyt. Algumas destas proteínas são tóxicas para importantes ordens de insetos, como *Lepidoptera*, *Diptera* e *Coleoptera*, e até mesmo para outros invertebrados, como nematóides, ácaros e protozoários (SCHNEPF *et al.*, 1998). Pelo fato de promover toxicidade sobre diferentes espécies de pragas agrícolas ou vetores de doenças humanas, o Bt se tornou o agente de controle microbiano mais utilizado mundialmente. Outro fator que contribuiu para esta ampla aceitação é a seletividade das toxinas de Bt, que têm pouco efeito sobre insetos não-alvos e vertebrados, como as aves e os mamíferos (KLIER, 2000; SIEGEL, 2001).

Os cristais de *B. thuringiensis*, ao serem ingeridos, são solubilizados no intestino médio – que é geralmente alcalino – do inseto susceptível, e as protoxinas, liberadas no lúmen, são ativadas por meio das proteases intestinais. As toxinas ativas se ligam a receptores específicos presentes na membrana das células epiteliais do intestino, provocando um desequilíbrio osmótico destas células, as quais sofrem lise e, conseqüentemente, têm o tecido do epitélio intestinal rompido. Posteriormente, a larva pára de se alimentar e as bactérias presentes no intestino invadem a hemocele, podendo causar a morte do inseto por inanição, septicemia ou por ambas, sinergicamente (SCHNEPF *et al.*, 1998; de MAAGD *et al.*, 2001; BRODERICK *et al.*, 2006).

As proteínas dos grupos Cry1 e Cry9 apresentam atividade contra a ordem *Lepidoptera*; as dos grupos Cry4 e Cry11 têm alta atividade contra *Diptera*; e as toxinas dos grupos Cry3, Cry7 e Cry8 são tóxicas para a ordem *Coleoptera* (SCHNEPF *et al.*, 1998; DELECLUSE *et al.*, 2000).

O interesse no uso de produtos à base de Bt, como alternativa ao controle químico, tem contribuído para que muitos grupos de pesquisa direcionem seus esforços no isolamento de cepas nativas, resultando no estabelecimento de coleções de Bt em várias partes do mundo, oriundas de diversas fontes e ambientes (MARTIN e TRAVERS, 1989; BERNHARD *et al.*, 1997).

A PCR (Reação em Cadeia da DNA Polimerase) é a técnica molecular mais usada na caracterização de cepas de *B. thuringiensis* e tem sido empregada tanto para identificar genes *cry* já conhecidos (BEN-DOV *et al.*, 1997; PORCAR e JUARÉZ-PÉREZ, 2003), como na identificação de novos genes *cry* (KUO e CHAK, 1996; JUARÉZ-PÉREZ *et al.*, 1997; BERÓN *et al.*, 2005).

O objetivo deste trabalho foi caracterizar cepas autóctones de *B. thuringiensis*, da coleção de *Bacillus* spp. da Embrapa Algodão, quanto à presença de genes *cry*.

MATERIAL E MÉTODOS

Extração do DNA plasmidial dos isolados de Bacillus spp.

As bactérias utilizadas são provenientes da coleção de *Bacillus* spp. do Laboratório de Biologia Molecular de insetos da Embrapa Algodão. Inoculou-se um papelote de cada isolado em 2mL de meio LB contendo 100µg/mL de penicilina G durante 16 horas. A extração de DNA foi realizada de acordo com Sambrook e Russel (2001).

Reação em Cadeia da DNA Polimerase – PCR

Neste experimento, foram utilizados primers das famílias *cry1*, *cry2*, *cry3*, *cry7*, *cry8* e *cry9* (JUAREZ-PEREZ, 2003). As condições nas reações de PCR foram as seguintes: 10ng de DNA; 1,25U de *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen); dNTP a 200 μ M; cada oligômero iniciador (Tabela 1) a 0,5 μ M, exceto os iniciadores I (+) e I (-), os quais foram usados a 1 μ M; MgCl₂ a 3mM e solução tampão para PCR (KCl a 50mM, Tris-HCl a 10mM, pH 8.3) em um volume final de 25 μ L. As amplificações foram realizadas em termociclador Biometra T-3000. As condições de temperatura foram as descritas pelos autores dos respectivos iniciadores utilizados. Dez microlitros de cada produto de PCR foram analisados por meio de eletroforese em gel de agarose a 0,8% (p/v) em solução 0,5X de TBE (Tris-HCl, ácido bórico e EDTA). Os géis foram corados com brometo de etídio.

Perfil protéico por meio de SDS-PAGE

O perfil protéico dos isolados selecionados foi determinado por meio da técnica SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis), conforme Thomas e Ellar (1983).

Bioensaios

Os bioensaios foram realizados de acordo com Arango *et al.* (2002), com algumas modificações. As cepas que apresentaram *amplicons* para os genes *cry* investigados nesta pesquisa (Tabela 1) foram crescidas em meio Bt, centrifugadas a 200rpm, a 30° C, durante 72 horas, até que a esporulação total da cultura fosse obtida. A ausência de contaminantes foi determinada por meio de microscopia ótica. Os ensaios foram realizados utilizando-se larvas de 1° instar de *S. frugiperda*. Após a dieta artificial ser colocada em placas de 24 poços, 50 μ L da cultura total esporulada foram colocados na superfície de cada poço com dieta. O experimento foi realizado com três repetições de 24 insetos de cada cepa, totalizando 72 insetos por tratamento. A cepa Btk EG7841 – recuperada do produto comercial Crymax®, Certis, EUA – e o meio Bt esterilizado foram utilizados nas mesmas condições, como padrão e testemunha, respectivamente.

Seqüenciamento de DNA e análise das seqüências

Os *amplicons* identificados com o tamanho esperado de massa molecular – descritos pelo autor do par de primers na PCR (Tabela 1) – foram purificados e seqüenciados no ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). As seqüências de DNA foram comparadas com os dados disponíveis no GeneBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST), BLAST N e BLAST P (versão 2.2.15) para confirmar a homologia entre elas (ALTSCHUL *et al.*, 1990).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O DNA plasmidial de todos os isolados foi extraído e submetido a PCR com os iniciadores (oligonucleotídios) para os genes *cry1*, *cry2*, *cry3*, *cry7*, *cry8* e *cry9*. No entanto, apenas nas cepas BV-5 e AN2-3 foram amplificados fragmentos com tamanho esperado, e estes foram obtidos utilizando-se os iniciadores gerais para o gene *cry1* [I(+)/I(-)] (Figura 1). Iniciadores específicos para o gene *cry1* também foram testados; porém, nenhum padrão caracterizando bandas inespecíficas foi reproduzível.

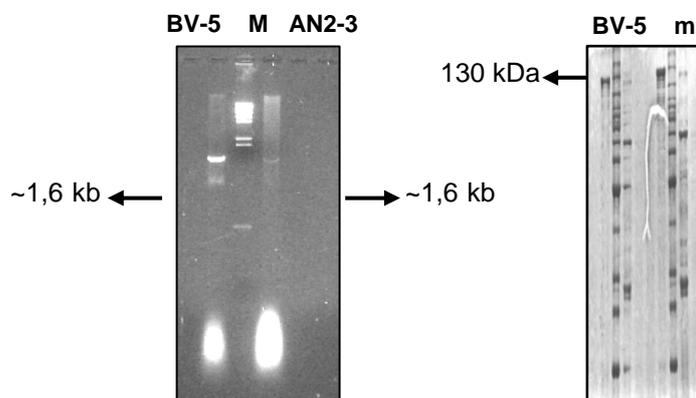


Figura 1: Perfil genético cepas BV-5 e AN2-3 e protéico da cepa BV-5. M. Marcador molecular *lambda/HindIII*; m. Marcador de peso molecular (Bench Mark™ Protein Ladder, Invitrogen).

Foram realizados bioensaios contra *S. frugiperda*, inseto relatado na literatura como susceptível a genes da família *cry1*. Utilizou-se a cultura total esporulada das cepas BV-5 e AN2-3 para verificar a sua atividade.

Porém, nenhuma cepa causou mortalidade acima de 10%, sendo, portanto, consideradas sem toxicidade para *S. frugiperda*.

Pela análise do perfil protéico, a cepa BV-5 apresentou uma banda única de aproximadamente 130kDa (Figura 1). A cepa AN2-3 apresentou um perfil atípico, com sete bandas variando entre 80 e 20kDa (dados não mostrados).

Por meio de reações de seqüenciamento, foram obtidas as seqüências parciais dos genes das cepas AN2-3 e BV-5. As seqüências de aminoácidos deduzidas dos genes destas cepas foram comparadas utilizando-se o BLAST P (proteína-proteína/NCBI). Foi constatado que, em vez de se obter uma identidade maior com proteínas Cry1, os fragmentos têm maior identidade com proteínas Cry8. Na cepa BV-5, o fragmento originado com o iniciador I (-) apresenta identidade de 91% com a proteína parcial Cry8 (YU *et al.*, 2006), e de 88% com a proteína Cry8Ba (Patente 5554534/EUA). Já o fragmento originado com o iniciador I (+) apresenta identidade de 75% com a proteína Cry8Aa e de 46% com a proteína Cry8Da (ASANO *et al.*, 2003). Na cepa AN2-3, a proteína deduzida por meio da seqüência gerada pelo iniciador I (-) apresentou maior identidade com a proteína Cry8Ba (Patente 5554534/EUA), 82%; em seguida, com a proteína parcial Cry8, 81%; e com a proteína Cry8Aa, 80%. A seqüência do iniciador direto I (+) não foi obtida. Foram realizadas PCR adicionais com os iniciadores dos genes *cry8Aa*, *cry8Ba* e *cry8Ca*; porém, não foi amplificado fragmento algum com estes iniciadores.

Neste estudo, foram caracterizadas duas cepas que apresentaram fragmentos de tamanhos esperados para os iniciadores gerais do gene *cry1*. No entanto, por meio de seqüenciamento e alinhamento, foi constatado que estes fragmentos têm maior homologia com proteínas Cry8.

Recentemente, alguns estudos identificaram novos genes da família *cry8* (ASANO *et al.*, 2003; BERÓN *et al.*, 2005, YU *et al.*, 2006). Estes genes são descritos na literatura como sendo patógenos para espécies da ordem *Coleoptera* (ASANO *et al.*, 2003; YU *et al.*, 2006).

PERSPECTIVAS

Os genes parcialmente descritos neste estudo são promissores, e por isso precisam ser mais bem caracterizados. Estas cepas poderão ser testadas contra os coleópteros que atacam as principais culturas produzidas no Brasil, tais como: *Anthonomus grandis* (bicudo-do-algodoeiro), *Eutinobothrus brasiliensis* (broca-da-raiz-do-algodoeiro), *Hypothenemus hampei* (broca-do-café), *Metamasius hemipterus* (besouro-rajado-da-cana), *Diabrotica speciosa* (larva-alfinete-do-milho) e *Cerotoma arcuatus* (vaquinha-da-soja), para determinar o inseto-alvo destas toxinas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTSCHUL, S. F. *et al.* Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403-410, 1990.
- ASANO, S. I. *et al.* A strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *galleriae* containing a novel *cry8* gene highly toxic to *Anomala cuprea* (Coleoptera: Scarabaeidae). **Biological Control**, v. 28, p. 191-196, 2003.
- ARANGO, J. A.; ROMERO, M.; ORDUZ, S. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Colombia with insecticidal activity against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, p. 466-474, 2002.
- BERNHARD, K. *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
- BERÓN, C. M.; CURATTI, L.; SALERNO, G. L. New strategy for identification of novel *cry*-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 761-765, 2005.
- BRODERICK, N. A.; RAFFA, K. F.; HANDELSMAN, J. Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. **Proceedings of National Academy of Science, USA**, v. 103, p. 15196-15199, 2006.
- de MAAGD, R. A.; BRAVO, A. CRICKMORE, N. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. **Trends in Genetics**, v. 17, n. 4, p. 193-199, 2001.
- DELÉCLUSE, A.; JUAREZ-PEREZ, V.; BERRY, C. Vector-active toxins: structure and diversity. In: CHARLES, J.-F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LEROUX, C. **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application**. Holanda: Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 101-125.
- JUARÉZ-PÉREZ, V. M.; FERRANDIS, M. D.; FRUTOS, R. PCR-based approach for detection of novel *Bacillus thuringiensis cry* genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 2997-3002, 1997.
- KLIER, A. *Bacillus thuringiensis*: risks assessment. In: CHARLES, J. -F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LEROUX, C. **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application**. Holanda: Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 485-504.
- KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics**, v. 5, p. 150-163, 2004.

KUO, W. S.; CHAK, K. F. Identification of novel *cry*-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains on the basis of restriction fragment length polymorphism of the PCR-amplified DNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 1369-1377, 1996.

MARTIN, P.A.W.; TRAVERS, R. S. Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, n. 10, p. 2437-2442, 1989.

PORCAR, M.; JUARÉZ-PÉREZ, V. PCR-based identification of *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal genes. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, p. 419-432, 2003.

SAMBROOK, J.; RUSSEL D. W. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. 3^a ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. pp. 120-134.

SCHNEPF, E. *et al.* *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 775-806, 1998.

SIEGEL, J. P. The mammalian safety of *Bacillus thuringiensis*-based insecticides. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 77, p. 13-21, 2001.

THOMAS, W. E.; ELLAR, D. J. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystal δ -endotoxin: effects on insects and mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Cell Science**, v. 60, p. 181-197, 1983.

YU, H. *et al.* Characterization of *Bacillus thuringiensis* strain Bt185 toxic to the Asian cockchafer: *Hollotrichia parallela*. **Current Microbiology**, v. 53, p. 13-17, 2006.

USO POTENCIAL DO INIBIDOR DE α -AMILASE DE TRIGO 0.53 NO CONTROLE DE BRUQUÍDEOS

Lima, J.N.^{1,2}; Oliveira Neto, O.B.^{2,4}; Valença, J.A.¹; Arboleda, J.W.¹; Mulinari, F.³; Grossi-de-Sá, M.F.²

¹UnB - Universidade de Brasília; ²EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia; ³UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, ⁴Centro Univeristário Unieuro.

janaina@cenargen.embrapa.br

RESUMO

Inibidores de α -amilase de plantas apresentam um grande potencial para uso biotecnológico, por meio da transformação de plantas visando resistência a insetos-praga. Para tanto, é muito importante identificar a especificidade de cada um desses inibidores. Alguns inibidores de α -amilase encontrados em grãos de trigo apresentam potencial inseticida contra os insetos-praga de grãos de feijão armazenado. Para o isolamento de inibidores de α -amilase, foram escolhidas plantas de trigo (*Triticum aestivum*) como fonte vegetal, em função da presença de inúmeras isoformas desses inibidores em suas sementes. O inibidor de α -amilase 0.53 foi purificado e caracterizado, e o gene para o inibidor 0.53 foi isolado via RT-PCR, utilizando-se cDNAs como molde. A seqüência para o inibidor 0.53 foi subclonada no vetor de expressão pPICZ α A (pFSP-pPICZ α A-0.53) e a expressão da proteína recombinante foi feita em células de levedura metilotrófica *Pichia pastoris*. Após o estabelecimento das condições de expressão, a proteína recombinante – expressada e secretada no meio de cultura – foi purificada via HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Performance). Ensaios *in vitro*, utilizando-se as α -amilases dos insetos-praga *Acanthocephalus obtectus*, *Zabrotes subfasciatus*, *Callosobruchus maculatus* e a α -amilase pancreática de Porco (PPA), mostraram que este inibidor é ativo contra a α -amilase digestiva do estágio larval desses insetos-praga. Porém, esta atividade é altamente dependente das condições de pH utilizadas durante os ensaios. Em pH 4.5, o inibidor 0.53 foi capaz de inibir unicamente as α -amilases dos diferentes insetos, não apresentando qualquer atividade para a amilase de mamífero PPA. Em pH 7.2, o inibidor recombinante 0.53 atuou unicamente sobre a PPA, inibindo cerca de 90% de sua atividade, não sendo ativo para α -amilases dos diferentes insetos-alvo testados. Os resultados deste trabalho reforçam a hipótese de que este inibidor de α -amilase pode fornecer uma vantagem evolucionária seletiva, impedindo o crescimento de insetos-praga que atacam grãos de feijão armazenado. Desta forma, o inibidor recombinante 0,53 também poderá ser utilizado em diversos estudos de toxicidade em mamíferos, bem como em estudos complementares de interação molecular, a fim de verificar sua segurança alimentar e o potencial uso biotecnológico.

INTRODUÇÃO

O feijão, *Phaseolus vulgaris* Linnaeus, 1753 (Fabaceae), é a leguminosa de maior importância como fonte de proteína vegetal, e, combinado com o arroz, constitui a dieta básica do brasileiro. O Brasil é o maior consumidor dessa leguminosa, com um consumo per capita, em 2003, ao redor de 16 Kg/ano, o que equivale a 44g/dia (VIEIRA *et al.*, 2006). Atualmente, o Brasil produz em torno de 3,1 milhões de toneladas, em aproximadamente 4 milhões de hectares, o que o coloca como o maior produtor mundial de feijão. Após a colheita, o feijão pode perder sua qualidade rapidamente se for armazenado de forma incorreta, especialmente devido à infestação por insetos. Os danos causados pelos insetos ao grão de feijão reduzem a sua qualidade, afetando a aparência, a palatabilidade e a aceitabilidade pelo consumidor, tornando-o inviável para o consumo devido ao mau aspecto, mau cheiro e alteração do sabor (EMBRAPA-CNPAF, 2006). As espécies *Zabrotes subfasciatus* (BOHEMAN, 1833) e *Acanthocephalus obtectus* (SAY 1831) (Coleoptera, Chrysomelidae, Bruchinae), conhecidos como carunchos do feijão, são as principais pragas do feijão armazenado, causando grandes perdas qualitativas e quantitativas em grãos e sementes, especialmente nas regiões mais quentes do mundo. O uso de variedades resistentes de feijão, aliado a outras medidas integradas de manejo de insetos-praga, tem recebido cada vez mais atenção como alternativa para o controle dos carunchos, sem as desvantagens dos inseticidas químicos (SILVA *et al.*, 1999; SHADE *et al.*, 1994).

Por apresentar inúmeras isoformas de inibidores de α -amilases, o trigo foi escolhido como fonte desta pesquisa, visando identificar um inibidor com forte capacidade inibitória e alta especificidade sobre as α -amilases de insetos-praga que atacam grãos de feijão armazenado.

Em 2000, FRANCO e colaboradores caracterizaram *in vitro* a especificidade dos inibidores de α -amilases presentes em sementes de trigo (*Triticum aestivum*). O inibidor 0.53 demonstrou a capacidade de inibir as α -amilases dos insetos *A. obtectus*, *Z. subfasciatus* e *Callosobruchus maculatus* e α -amilase Pancreática de Porco (PPA), de forma diferenciada. Nos ensaios, em pH 5.5 o inibidor 0.53 apresentou preferencialmente atividade contra as α -amilases dos bruquídeos *A. obtectus*, *Z. subfasciatus* e *C. maculatus*, e apresentou baixa atividade para α -amilase PPA. Estes dados indicaram o inibidor 0.53 como promissor para uso biotecnológico no controle de bruquídeos (FRANCO, 2000).

Com relação às especificidades, foi a primeira vez que se observou uma diferença funcional (relacionado a PPA) entre os inibidores 0.19 e 0.53 de trigo. Outro importante resultado dessa pesquisa foi a demonstração da atividade do inibidor 0.53 contra α -amilases de *A. obtectus*. Esta foi também a primeira vez que um inibidor de α -amilase se mostrou ativo *in vitro*, contra as α -amilases deste importante inseto-praga de grãos de feijão armazenado (FRANCO, 2000).

Visando a utilização do inibidor 0.53 no controle de insetos-praga de armazenamento, num primeiro momento, o gene que codifica este inibidor foi isolado a partir de cDNAs de sementes de trigo, cultivar BR35 (FRANCO, 2000). Com base nestes dados, e dando continuidade às pesquisas, este trabalho teve como objetivo expressar o cDNA do inibidor 0.53 em células de levedura metilotrófica *Pichia pastoris* e avaliar o efeito inibitório *in vitro* do inibidor recombinante sobre as α -amilases de diferentes insetos-praga de grãos armazenados de feijão, para posterior aplicação biotecnológica.

MATERIAL E MÉTODOS

Material biológico

Larvas de *A. obtectus*, *Z. subfasciatus* foram obtidas da coleção existente no LIMPP – Laboratório de Interação Molecular Planta-Praga, da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - CENARGEN. Larvas de *C. maculatus* foram obtidas da coleção de insetos do laboratório de bioquímica da Universidade Católica de Brasília.

Construção do vetor de expressão

Para a amplificação do inibidor de α -amilase 0.53, foi usada a técnica de PCR, utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores. O Vetor utilizado para expressão heteróloga em *P. pastoris* foi o pPICZ α A, previamente digerido com *EcoRI* e *XbaI* para receber o inibidor 0.53. Após ser digerido com *EcoRI* e *XbaI* a 37° C durante 2 horas, e purificado do gel de agarose utilizando o kit QIAquick Spin Gel Purification kit (QIAGEN), o fragmento de aproximadamente 400pb referente ao inibidor 0.53, foi clonado no vetor pFSP-pPICZ α A-0.53. As concentrações de DNA (vetor: inserção) utilizadas nos sistemas de ligação variavam de acordo com o experimento a ser realizado, sendo normalmente a uma razão molar de 1:3. A reação de ligação foi feita em tampão de ligase 1X, contendo 10 a 200U de T₄ DNA ligase. Os sistemas continham 20 μ L de volume final e após incubação a 16° C, durante 16 a 20 horas, eram usados para transformar células de *P. pastoris* (linhagem GS115) por eletroporação. Após a transformação, as células foram plaqueadas em meio YPDS-ágar com Zeocina para selecionar colônias positivas. O DNA plasmidial das colônias positivas foi extraído conforme protocolo de extração plasmidial. Os clones analisados apresentaram fragmentos de aproximadamente 400pb.

Meios de cultura para Expressão em leveduras

A linhagem de levedura utilizada foi *Pichia pastoris* GS115. Inicialmente, utilizou-se BMGY (*Buffered Glycerol Complex Medium*), 2YP 50%, Fosfato de Potássio, pH 6.0, 100mM, YNB 1,34% (p/v), Biotina 4x10⁻⁵% (p/v), Glicerol, 1% (v/v), para produzir massa celular e posteriormente BMMY (*Buffered Methanol Complex Medium*), 2YP 50%, Fosfato de potássio, pH 6.0, 100mM, YNB 1,34% (p/v), Biotina 4x10⁻⁵% (p/v), L-Arginina 200mM, Casaminoácidos 2%, EDTA 5mM, Metanol 0,5% (v/v), para expressão do inibidor 0.53. Para o preparo dos meios BMGY e BMMY, uma solução de extrato de levedura e peptona de caseína foi autoclavada separadamente e foram adicionados os demais reagentes previamente esterilizados por filtração (YNB, Biotina, EDTA e metanol), ou por autoclavagem (glicerol e tampão fosfato de potássio), adicionando água estéril para completar o volume.

Cromatografia líquida de alta performance (HPLC)

A fração correspondente ao inibidor 0.53 foi coletada em coluna de filtração molecular e solubilizada em ácido trifluoracético (TFA) 0,1%, preparado em água Milli-Q ultra pura (solução A). O sobrenadante da expressão foi liofilizado e 1mg de extrato total de proteínas liofilizadas foram ressuspensas em água Milli-Q e aplicadas em coluna de fase reversa semi-preparativa Bio Rad C18, inicialmente equilibrada com a solução A, com um fluxo de 1,0mL/min. O inibidor 0.53 foi eluído com 49% de acetonitrila em 0,1% de TFA (solução B), monitorando-se o perfil cromatográfico a 216nm. As frações protéicas referentes ao inibidor 0.53 foram liofilizadas e armazenadas a -20° C.

Ensaio in vitro do inibidor de α -amilase 0.53

A atividade do inibidor 0.53 contra a α -amilase de *Z. subfasciatus*, *A. obtectus* e *C. maculatus*, pode ser detectada pelo método iodométrico usando amido a 0,25% como substrato. Os ensaios foram feitos em triplicata. Foram utilizados dois controles: o controle da enzima, contendo apenas enzima alvo e tampão, e o controle do amido, contendo tampão e amido. Para cada ensaio de atividade inibitória, foram usados

6 μ g do inibidor 0.53 purificado. A reação com insetos foi feita em tampão succínico, pH 4.5, PPA em tampão Tris-HCl 0.1M, pH 7.2 e o volume final de 120 μ L. Primeiramente, a enzima alvo foi pré-incubada com o inibidor 0.53 durante 10 minutos, a 37° C, para que o complexo enzima/inibidor pudesse acontecer. A partir deste tempo de pré-incubação, a reação foi disparada com amido. O tempo de reação foi de três minutos. As reações foram paradas com adição de 500 μ L de Iodo. A leitura foi feita com absorbância a 590nm.

A atividade do inibidor 0.53 foi expressa em porcentagem de inibição. Para isto, foi definido que uma unidade de atividade da α -amilase correspondia ao decréscimo de 0,001 unidade de absorbância a 590nm, e a unidade de inibição foi definida como a unidade de leitura da enzima que aumenta 0,001 de absorbância a 590nm.

Para o ensaio de termoestabilidade, a enzima de *A. obtecus* foi incubada com o substrato (amido) – conforme o item 9.12 – em pH 4.5 e submetida a tratamento térmico de 30° C, 40° C, 50° C e 60° C. A inibição da atividade enzimática foi verificada utilizando-se o espectrofotômetro, descrito anteriormente. A atividade do inibidor 0.53 em diferentes pHs foi determinada pela incubação da enzima e do inibidor em tampão succinato, com CaCl₂ 200mM e NaCl 200mM, pH 4.0 e tampão Tris/HCl 0.1M pH 7.2. A inibição da atividade enzimática foi verificada utilizando-se o espectrofotômetro.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Expressão heteróloga do inibidor 0.53 em *P. Pastoris*

Foi escolhido um clone para o experimento de cinética de indução da proteína recombinante, visando a determinação do melhor tempo de coleta do sobrenadante da cultura de *P. pastoris*. Um mililitro do sobrenadante da cultura foi coletado nos tempos de indução 0, 24, 48 e 72 horas. As proteínas do sobrenadante foram concentradas com TCA (ácido tricloro acético) para melhorar a visualização em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) e analisadas após a coloração com prata.

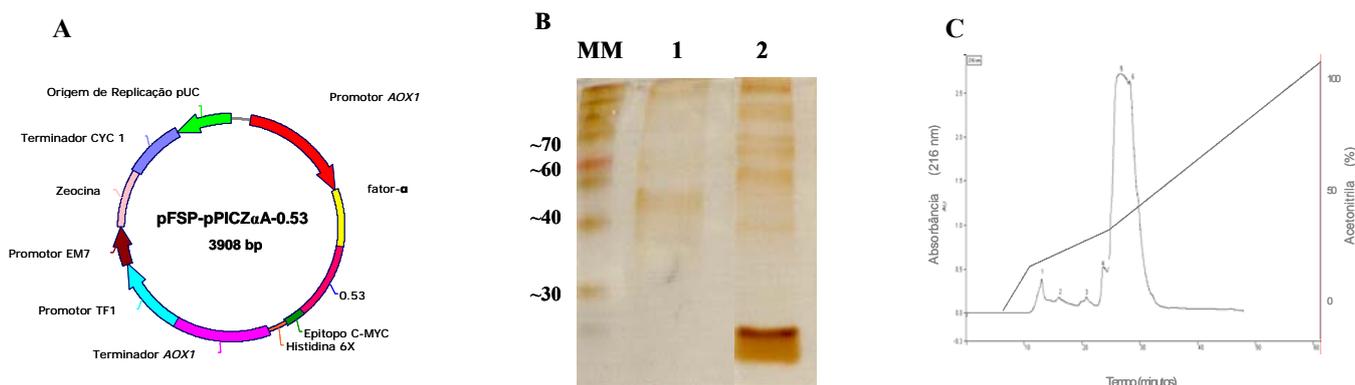


Figura 1 **A**: Representação esquemática do vetor pFSP-pPICZ α A-0.53, utilizado-se para a expressão do gene do Inibidor 0.53 de trigo, em *Pichia pastoris*. O gene do inibidor 0.53 foi inserido entre os sítios de *Eco*RI e *Xba*I do múltiplo sítio de clonagem vetor pPICZ α A. **B**: Expressão heteróloga do inibidor 0.53 em *Pichia pastoris* e análise em gel SDS-PAGE 15% corado com nitrato de prata. A expressão foi induzida com 1% de metanol a cada 24 horas. **A**: Expressão com 48 horas de indução com metanol 1%. **MM**: Marcador de massa molecular BenchMark Prestained Protein Ladder. **1**: Controle expressando o vetor pPICZ α A. **2**: Colônia expressando o vetor pFSP-pPICZ α A-0.53. **B**: Perfil cromatográfico do inibidor 0.53 em coluna líquida de alta pressão (BioRad C18). A fração 5 contendo o inibidor ativo foi eluída em 40,5% de acetonitrila sob fluxo de 1mL/min.

Ensaio in vitro de atividade inibitória de α -amilases

O objetivo destes ensaios foi a avaliação da atividade inibitória *in vitro* do 0.53 recombinante sobre as α -amilases dos insetos-praga *A. obtecus*, *Z. subfasciatus*, *C. maculatus* e PPA, os quais atacam grãos de feijão armazenados.

Foram realizados ensaios iodométricos para avaliar a estabilidade da atividade enzimática de *A. obtecus* com variação de pH e temperatura. Pode ser observado que as condições de pH entre 5.0 e 6.0 (Figura 4.7) e temperatura de 55° C (Figura 4.7), foram ideais para a complexação da α -amilase de *A. obtecus* com o substrato utilizado (amido).

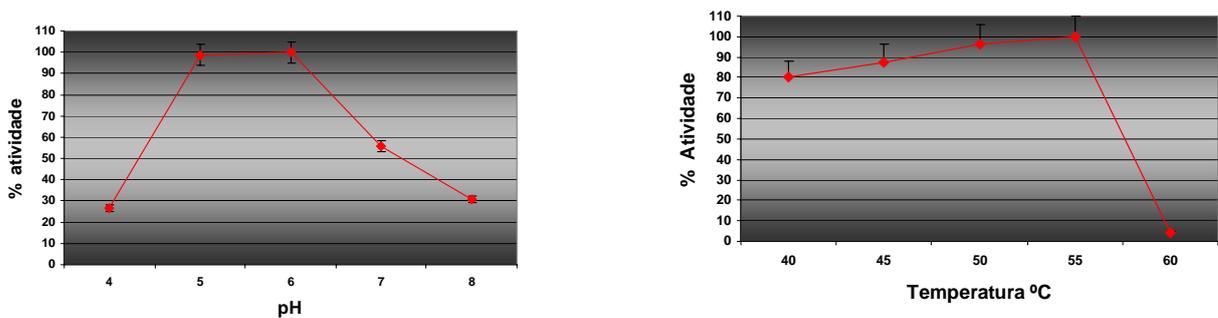


Figura 3 **A**: Determinação das melhores condições da atividade enzimática da α -amilase de *A. obtectus* em diferentes pHs. Ensaio realizado com extrato total de larvas. A enzima foi encubada com amido 0.25% em tampão succínico com 0.02M de CaCl_2 e 0.02M de NaCl , pH 4.5 e 6 e em tampão Tris-HCl 0.1M pH 7 e 8, a 37° C. **B**: Efeitos da temperatura na atividade amilolítica de *A. obtectus*. Ensaio realizado com extrato total de larvas em diferentes temperaturas, utilizando-se amido 0.25% em tampão succínico com 0.02M de CaCl_2 e 0.02M de NaCl , pH 4.5 a 37° C.

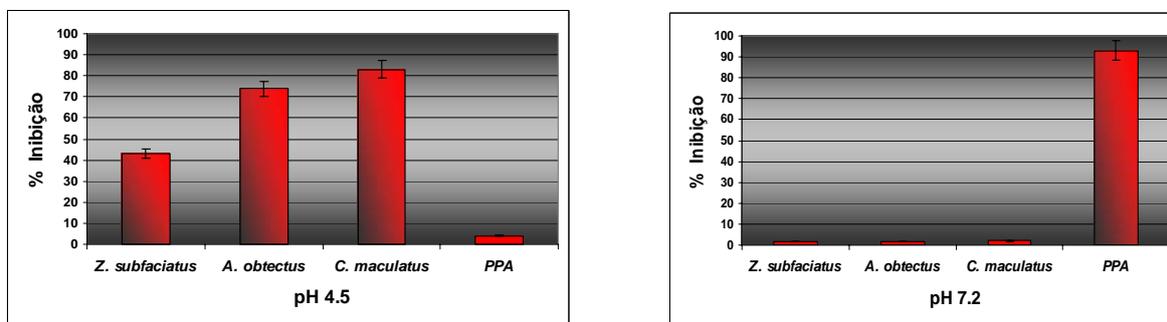


Figura 4 **A**: Inibição *in vitro* das α -amilases de *A. obtectus*, *Z. subfasciatus*, *C. maculatus* e α -amilase Pancreática de Porco (PPA), pela proteína recombinante do inibidor 0.53 ($6\mu\text{g}/\mu\text{L}$) expressa em levedura metilotrófica *P. pastoris*, em tampão succínico com 0.02M de CaCl_2 e 0.02M de NaCl , pH 4.5 em temperatura de 37° C. Ensaio realizado com extrato total de larvas dos diferentes insetos-praga. **B**: Inibição *in vitro* das α -amilases de *A. obtectus*, *Z. subfasciatus*, *C. maculatus* e α -amilase Pancreática de Porco (PPA), pela proteína recombinante do inibidor 0.53 ($6\mu\text{g}/\mu\text{L}$) expressa em levedura metilotrófica *P. pastoris*, em tampão Tris-HCl 0.1M, pH 7.2 e temperatura de 37° C. Ensaio realizado com extrato total de larvas dos diferentes insetos-praga.

Com este trabalho, foi possível estabelecer as condições ideais de expressão do inibidor 0.53 na levedura metilotrófica *P. pastoris*. A purificação do inibidor 0.53 via HPLC se mostrou eficiente para pequenas quantidades; para uma purificação em larga escala, as condições deverão ser devidamente ajustadas. A partir dos dados obtidos neste trabalho, pode-se ter a certeza de que o inibidor 0.53 recombinante foi expresso na sua forma ativa, pois mostrou atividade em pH 4.5, principalmente sobre os insetos-praga *A. obtectus*, *C. maculatus* e *Z. subfasciatus*. Entretanto, em pH 7.2, o inibidor recombinante foi ativo somente sobre PPA.

PERSPECTIVAS

Os parâmetros de expressão podem ser melhorados, a fim de se obter uma produção mais elevada, apesar dos resultados terem sido satisfatórios em frascos. Entre os fatores a serem mais bem estabelecidos estão o meio de cultura e a oxigenação. Uma alternativa para melhorar o rendimento seria a fermentação em bioreatores. Uma vez estabelecidos os parâmetros para fermentação em bioreatores, outras proteínas também poderão ser expressadas com sucesso neste sistema. A fermentação em bioreatores permite o aumento substancial da quantidade de proteína produzida e em menor tempo.

Vencidas as etapas de otimização da produtividade e purificação, poderão ser feitas análises nutricionais e histoquímicas em mamíferos. Esses testes permitirão esclarecer a concentração/quantidade do inibidor 0.53 tolerada pelo organismo de mamíferos e o nível de toxicidade atribuído ao inibidor.

Além disso, existe um projeto de transformação de plantas, via biobalística e *Agrobacterium*, em andamento dentro do grupo de pesquisa liderado pela Dra. Fátima Grossi, no Laboratório de Interação Molecular Planta-Praga (LIMPP). Plantas de feijão estão sendo transformadas com vetores de expressão heteróloga direcionados para plantas, paralelamente a este trabalho, com vários inibidores de α -amilase, inclusive o 0.53. Estes experimentos de transformação visam a produção de plantas biologicamente resistentes a insetos-praga que atacam grãos armazenados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VIEIRA, C.; TRAZILBO J.P.J; BORÉM, A. **Feijão**. 2ª Edição, Editora UFV, 600p, 2006.

FRANCO, O. L. **Potencial dos Inibidores de α -amilases e de proteinases no Controle de Insetos Praga de Plantas Economicamente Importantes**. 83 p. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) – Universidade de Brasília, Brasília, 2000.

SILVA, S.P.; TERRA, W.R.; XAVIER-FILHO, J.; GROSSI-DE-SÁ, M.F.; LOPES, A.R.; PONTES, E.G. Digestion in larvae of *Callosobruchus maculatos* e *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera:Bruchidae) with emphasis on alpha-amylase and oligossacaridases. **Insect Biochemistry Molecular Biology**. v. 29, p. 355-366, 1999.

SHADE, R.E.; SCHROEDER, H.E.; PUEYO, J.J. Transgenic pea seeds expressing the alpha-amylase inhibitor of the common bean are resistant to bruchide beetles. **Bio/Technology**, 12, p. 793-796, 1994.

EMBRAPA-CNPAF. Origem e História do Feijão. Goiânia-GO. Disponível em <http://www.cnpaf.embrapa.br/feijao/historia.htm>. Acesso em agosto de 2006.

GERAÇÃO DE BIBLIOTECA COMBINATÓRIA DE GENES DE DEFENSINAS E IDENTIFICAÇÃO DE VARIANTES COM POTENCIAL ANTIMICROBIANO CONTRA FUNGOS PATOGÊNICOS DE ALGODOEIRO E SOJA

Silva, M.C.M.¹; Dias, G.C.^{1,3}; Silva, M.S.²; Lacerda, A.F.^{1,3}; Del Sarto, R. P.¹; Rocha, T.L.¹; Oliveira Neto, O.B.^{1,5}; Coutinho, M.V.¹; Bezerra, I.C.⁴; Grossi-de-Sá, M.F.^{1,3}

¹EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia; ²EMBRAPA Cerrados; ³UCB-Universidade Católica de Brasília; ⁴EMBRAPA Hortaliças, ⁵Centro Universitário Unieuro.
cristina@cenargen.embrapa.br

RESUMO

Dentre as doenças de plantas, as fúngicas são as que causam maiores perdas agrônômicas e econômicas no Brasil e no mundo. Neste contexto, destacam-se as grandes perdas de produção resultantes da infecção por fungos causadores da ramulose do algodoeiro (*Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* A. S. Costa), ferrugem asiática da soja (*Phakopsora pachyrhizi* H. & P. Syd.), podridão branca da haste da soja (*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, podridão vermelha da raiz ou síndrome da morte súbita da soja (*Fusarium solani* (Mart.) Sacc. f. sp. *glycines* = *Fusarium tucumaniae* T. AOKI *et al.*; AOKI *et al.*, 2003) e podridão do carvão da soja (*Macrophomina phaseolina*). Além de não existirem variedades de elevado potencial agrônômico com resistência durável a essas doenças, nenhuma dessas patologias é satisfatoriamente controlada pela aplicação de fungicidas, o que as torna um fator limitante na maioria das regiões produtoras do Brasil. Estratégias biotecnológicas que visam a produção de plantas contendo transgenes com potencial para proteção contra a infecção por fungos, representam uma alternativa promissora para gerar espécies resistentes a estas doenças. Naturalmente, para se defenderem de ataques de patógenos, as plantas produzem proteínas antimicrobianas de defesa, denominadas defensinas. O objetivo principal deste trabalho é produzir e selecionar genes novos de defensinas com potencial atividade antimicrobiana contra fungos de importância agrônômica e econômica da soja e do algodoeiro. Para tanto, genes selvagens de defensinas de vegetais foram recombinados via *DNA shuffling*. O produto gerou uma biblioteca contendo 10⁴ genes variantes que estão sendo caracterizados quanto à conservação da estrutura, baseando-se em análises das estruturas secundária e terciária das moléculas variantes. Os novos genes variantes serão expressos em sistema heterólogo e a atividade das defensinas variantes será testada contra os fungos-alvo.

INTRODUÇÃO

Dentre as doenças de plantas, as fúngicas são as que causam maiores perdas no Brasil. Neste contexto, destacam-se as grandes perdas de produção causadas pelos fungos *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* A. S. Costa (ramulose do algodoeiro) e *Phakopsora pachyrhizi* H. & P. Syd. (ferrugem asiática da soja). Além da ferrugem asiática, há outras doenças da soja de difícil controle, por serem causadas por fungos de raízes, como *Macrophomina phaseolina* (podridão de carvão das raízes da soja) *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary (podridão branca da haste da soja) e *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. f. sp. *glycines* (= *Fusarium tucumaniae* T. AOKI *et al.*; AOKI *et al.*, 2003; podridão vermelha da raiz ou síndrome da morte súbita da soja).

A soja é uma das principais *commodities* mundiais, e o Brasil é o segundo maior produtor mundial deste grão. A expansão dos fungos, principalmente os causadores da ferrugem asiática, contribuiu drasticamente para a redução na produção nas últimas safras. Até o momento, o controle é paliativo, baseado em aplicações de fungicidas e na rotação de culturas, dentre outras medidas. Além da soja, outra cultura de grande importância no Brasil é o algodoeiro. A ramulose está entre as doenças mais importantes do algodoeiro no Brasil, e encontra-se disseminada em praticamente todo o país (IAMAMOTO, 2003). A ramulose não é satisfatoriamente controlada por meio da aplicação de fungicidas. As medidas para o controle dessa patologia envolvem manejos culturais e uso de fungicidas, uma vez que não existem variedades resistentes com elevado potencial agrônômico.

Dentre as possíveis soluções para o controle de relevantes doenças fúngicas da soja e do algodoeiro, uma das mais eficientes e favoráveis do ponto de vista econômico e ambiental é a resistência genética. Neste contexto, a transgenia, utilizando genes para resistência específica, pode representar uma alternativa ambientalmente e economicamente mais sustentável para o controle de doenças fúngicas, por resultar na redução do uso de controle químico.

As defensinas de plantas são pequenos peptídeos (cerca de 50 aminoácidos) usualmente básicos, presentes em várias espécies de plantas (BART *et al.*, 2002). Muitas defensinas de plantas podem inibir o crescimento de amplo espectro de fungos e não apresentam toxicidade para células de mamíferos e de vegetais (MORENO *et al.*, 1994). Genes de defensinas têm sido utilizados com sucesso na engenharia

genética para a produção de espécies com resistência a doenças fúngicas (GAO *et al.*, 2000; TERRAS *et al.*, 1995).

Este estudo tem como objetivo gerar variabilidade de genes codificadores de defensinas para testar a atividade das novas moléculas expressas em ensaios de inibição do crescimento e/ou inibição da germinação de esporos de fungos patogênicos relevantes para as culturas de soja e algodão. Os novos genes de defensinas gerados para o controle de fungos poderão ter a vantagem de não estarem contemplados em patentes vigentes. Ademais, os novos genes de defensinas gerados poderão ser utilizados em estratégias de pirimidização de transgenes, visando contornar a quebra de resistência em condições de campo.

MATERIAL E MÉTODOS

Genes de defensinas parentais para DNA shuffling

Os clones de defensinas CD1 e CD2 foram identificados no banco de dados do transcriptoma do café (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/cafe/>). Os outros genes utilizados apresentam conhecida atividade antifúngica: *SD2* (defensina de girassol, fornecido por Laura de la Canal, Universidad Nacional de Mar del Plata, Argentina), *PsD1* (defensina de ervilha, fornecido por Eleonora Kurtenback, Universidade do Rio de Janeiro), *DRR230a* (defensinas de ervilha, fornecidos por Pierre Fobert, National Research Council, Canadá).

Fungos fitopatogênicos de algodoeiro e soja

Os fungos utilizados neste trabalho foram obtidos de coleções particulares de várias unidades da Embrapa e estão sendo mantidos em laboratório e casa de vegetação.

DNA Shuffling e Construção de biblioteca combinatória

Os genes parentais do *DNA Shuffling*, *DRR230a*, *PsD1*, *SD2*, *CD1* e *CD2*, foram amplificados por PCR utilizando-se *primers* para inserir seqüências âncoras nas extremidades 3' e 5' (Tabela 1). Após a purificação dos produtos, uma mistura contendo 2µg de DNA de cada gene parental foi utilizada na técnica de *DNA shuffling*, segundo procedimento descrito por STEMMER *et al.*, 1994 e ZHAO & ARNOLD, 1997. A enzima *DNase I* (35µL de *DNase I* 15U/mL) foi usada na reação de fragmentação de DNA de defensinas parentais (10µg) incubada a 15° C durante vinte minutos. Primeiramente, os pequenos segmentos obtidos da digestão foram recombinados em reação tipo PCR, sem a presença de *primers*. Para a segunda PCR, foram utilizados como molde 1,5µL do produto da primeira reação e adição dos *primers* SHUF-03-forBamH e SHUF-04-revNotI (Tabela 1). A amplificação gerou uma população de genes variantes de massa molecular similar a dos genes parentais. Em seguida, o produto do *DNA shuffling*, purificado de gel de agarose, foi digerido com as enzimas *BamH I* e *Not I* e clonado no vetor pCR2.1 (Invitrogen®), linearizado com as mesmas enzimas. A construção foi utilizada para transformar células de *Escherichia coli* e originar a biblioteca de genes variantes de defensinas.

Tabela 1 – Oligos para amplificação de genes utilizados no *DNA shuffling*

Primer	Seqüência
SD2-02-rev	5' <u>ggt caa gga gcc gtt</u> <u>aca atg agt ggt aca</u> 3' âncora 2
SD2-03-for	5' <u>gat cac gcg tat cga</u> <u>agg aca tgt gag</u> 3' âncora 1
DRR230A-05-for	5' <u>gat cac gcg tat cga</u> <u>aac acc tgt gag aat ttg</u> 3' âncora 1
DRR230A-06-rev	5' <u>ggt caa gga gcc gtt</u> <u>aca gtt ttt agt gca cca</u> 3' âncora 2
PsD1-02-rev	5' <u>ggt caa gga gcc gtt</u> <u>aca gtt ttg acc aca</u> 3' âncora 2
PsD1-03-for	5' <u>gat cac gcg tat cga</u> <u>aag act tgt gaa</u> 3' âncora 1
CD1-01-for	5' <u>gat cac gcg tat cga</u> 3' âncora 1
CD1-02-rev	5' <u>ggt caa gga gcc gtt</u> 3' âncora 2
SHUF-03-forBamHI	5'gta ggatcc <u>caccaccaccac</u> <u>Cat</u> <u>cac gcg taC</u> <u>cga</u> 3' BamHI His tag âncora 1
SHUF-04-revNotI	5' ttt <u>tca</u> actt gggccgc <u>ttaaata</u> <u>gttcaaggagcTggt</u> 3' Not I stops âncora 2

Legenda: Em fundo cinza, parte homóloga ao gene parental de defensina; em fundo vermelho, *stop codons* inseridos artificialmente; em cor rosa, cauda de histidina – para posterior purificação; sublinhado simples, seqüência Ancôra 1 (região 5’); sublinhado duplo, seqüência Ancôra 2 (região 3’); as barras na cor cinza nos primers CD1 escondem a seqüência da extremidade 3’ porque a sequência não está disponível para publicação.

Análises de genes variantes de defensinas

Centenas de clones da biblioteca combinatória foram analisados por “PCR de colônias”. Os clones apresentando amplificação no tamanho aproximado ao dos genes de defensinas parentais foram preparados e submetidos a seqüenciamento automático. As seqüências foram analisadas utilizando-se os programas OrFinder (disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf>) e ClustalW (disponível em <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). Os alinhamentos foram obtidos em comparação com outras seqüências de defensinas encontradas nos bancos de dados públicos. Após a análise das seqüências, as que mostraram pelo menos seis cisteínas conservadas foram selecionadas. Essas seqüências serão utilizadas para confecção de modelos tridimensionais visando a confirmação da manutenção da estrutura terciária típica de defensinas, apesar das mutações geradas na estrutura primária.

Desenho de bioensaios com P. pachyrhizi.

(i) *Bioensaio in vivo*: folhas jovens de soja, destacadas e previamente desinfetadas com hipoclorito de sódio, foram mantidas em meio MS. As folhas foram inoculadas com uma suspensão de urediniósporos (10^4 esporos/mL). Tais condições de bioensaio foram determinadas para testar inibição de crescimento micelial por defensinas variantes e parentais.

(iii) *Bioensaio in vitro*: urediniósporos coletados por lavagem das folhas infectadas (provenientes de casa de vegetação) foram suspensos em água destilada contendo Tween 20 e ajustados para diluição de 10^4 esporos/mL. Os urediniósporos foram plaqueados em meio de cultura ágar-água estéril e incubadas a 24° C, no escuro, durante 24 horas. Foram considerados germinados os urediniósporos que apresentavam tubo germinativo com tamanho superior ao do esporo. Tais condições de bioensaio foram estabelecidas para testar a inibição de germinação de urediósoros por defensinas variantes e parentais.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Geração de biblioteca combinatória e seleção de genes variantes de defensinas

A tecnologia do *DNA shuffling* é uma ferramenta poderosa para a geração de grande variabilidade de novos genes, que podem ser selecionados de acordo com as características desejadas. Na agricultura, esta tecnologia vem sendo utilizada com sucesso no melhoramento de genes que poderão solucionar problemas específicos, tais como o desenvolvimento de resistência a estresse biótico e/ou abiótico.

O produto de *DNA shuffling* de genes parentais de defensinas (Figura 1), inserido no vetor pCR2.1, resultou em uma biblioteca combinatória contendo $2,1 \times 10^4$ ufc/mL.

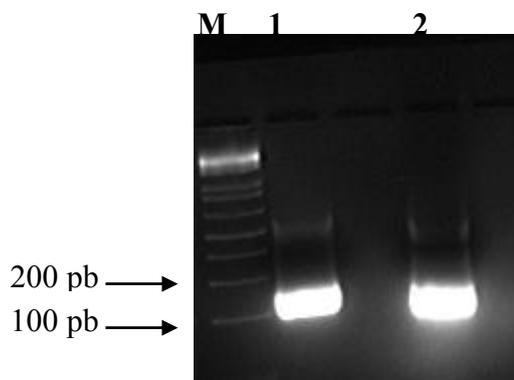


Figura 1 – Produto de *DNA shuffling* de genes de defensinas vegetais analisado em gel de agarose 2,5%. M. Marcador de massa molecular; 1. Alíquota da mistura de genes de defensinas utilizada para fragmentação com *DNAse I*; 2. Amplificação do produto de recombinação utilizando os oligos SHUFF-03-forBamHI e SHUFF-04-forBamHI (Tabela 1).

Análises de genes com potencial para o controle de fungos

Antes de serem expressas em um sistema que permita a avaliação da atividade sobre o fungo alvo, as defensinas variantes obtidas via *DNA shuffling* precisam ser analisadas quanto ao tipo de mutações geradas e às conseqüências na estrutura das moléculas. Os critérios para identificação de seqüências de aminoácidos típicas de defensinas englobam a presença de resíduos básicos no N-terminal e a quantidade de cisteínas suficiente para formação de, pelo menos, seis pontes dissulfeto. Até o momento, 39 seqüências foram obtidas por seqüenciamento automático. Em análises preliminares dessas seqüências, comparadas com as seqüências de duas defensinas de *Arabidopsis* extraídas do banco de dados, foram identificadas três seqüências apresentando seis cisteínas conservadas, duas seqüências apresentando sete cisteínas conservadas e uma seqüência com oito cisteínas conservadas. Clones adicionais estão sendo analisados para a identificação de maior número de seqüências apresentando estrutura primária típica de defensinas. A escolha dos clones para serem expressos e testados em bioensaios será finalmente concluída após as análises de modelos tridimensionais em construção.

Estabelecimento de condições de bioensaios com P. Pachyrhizi

Em folhas destacadas de soja mantidas em meio MS, foram observados sintomas de ferrugem asiática três dias após a inoculação de urediósporos de *P. Pachyrhizi*. No entanto, tendo em vista o alto índice de contaminação por fungos saprófitas no meio MS, não é recomendável o bioensaio em folha destacada mantida em meio de cultura. Alternativamente, recomendam-se bioensaios em folha destacada mantida em papel de filtro esterilizado e úmido.

O experimento realizado para testar a germinação dos urediniósporos *P. Pachyrhizi* em meio de cultura agar-água revelou que este tipo de bioensaio é promissor para avaliar a atividade das defensinas sobre a inibição da germinação de esporos de *P. Pachyrhizi*.

PERSPECTIVAS

Os clones de defensinas variantes selecionados da biblioteca combinatória serão subclonados e expressos em sistema de levedura *Pichia pastoris*, utilizando-se o vetor pPICZIIA (Invitrogen), que direciona a secreção da proteína expressa para o meio de cultura. Nos experimentos de expressão em levedura, serão utilizados como controle *P. pastoris* GS115 não transformada e transformada com o plasmídeo pPICZIIA sem gene.

Uma vez expressas e purificadas, as defensinas variantes provenientes da biblioteca combinatória serão testadas contra o crescimento micelial e/ou contra a germinação de esporos de fungos patogênicos de algodoeiro e soja.

O presente trabalho abre perspectivas para a identificação de novos genes de defensinas que apresentam atividade contra os fungos que atacam algodoeiro e soja, os quais serão utilizados na geração de plantas transgênicas resistentes a relevantes doenças fúngicas.

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.; BRESSAN, R. A. Antifungal activity of tobacco osmotin has specificity and involves plasma membrane permeabilization. **Plant Science**, v. 118, p. 11-123, 1996.
- AOKI, T.; O'DONELL, K.; HOMMA, Y.; LATTANZI, A. R. Sudden-death syndrome of soybean is caused by two morphologically and phylogenetically distinct species within the *Fusarium solani* species complex – *F. virguliforme* in North America and *F. tucumaniae* in South America. **Mycologia**, v. 95, p. 660-684, 2003.
- BART P. H. J.; THOMMA-BRUNO, P. A.; CAMME, K. T. Plant defensins. **Planta**, v. 216, p. 193-202, 2002.
- CATANAZARITI, A.N; SOBOLEVA, T. A.; JANS, D.A.; BOARD, P.G.; BAKER, R. T. An efficient system for high –level expression and easy purification of authentic recombinant proteins. **Protein Science**, v. 13, p. 1331-1339, 2004.
- GAO, A.-G.; HAKIMI, S. M.; MITTANCK, C. A.; WU, Y.; Woerner, B. M.; Stark, D. M.; Shah, D. M.; Liang, J.; Rommens C. M. T. Fungal pathogen protection in potato by expression of a plant defensin peptide. **Nature Biotechnology**, v.18, p.1307-1310, 2000.
- IAMAMOTO, M. M. Doenças foliares do algodoeiro. Fundação de Estudos e Pesquisas em Agronomia, Medicina Veterinária e Zootecnia - **FUNEP**, Jaboticabal, 2003.
- MORENO, M.; SEGURA, A.; GARCÍA-OLMEDO, F. Pseudothionin-St1, a potato peptide active against potato pathogens. **European Journal of Biochemistry**, v.223, 135-139. 1994
- STEMMER, W. P. Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. **Nature**, v. 370, p.324-325, 1994.

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

TERRAS, F. R. G.; EGGERMONT, K.; KOVALEVA, V.; RAIKHEL, N. V.; OSBORN, R. W.; KESTER, A.; REES, S. B.; VANDERLEYDEN, J.; CAMMUE, B. P. A. & BROEKAERT, W. F. Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense. **Plant Cell**, v.7, p.573-588, 1995.

VARIANTES DE INIBIDORES DE α -AMILASES SELECIONADOS POR *PHAGE DISPLAY* COM ATIVIDADE PARA α -AMILASES DO BICUDO DO ALGODOEIRO (*Anthonomus grandis*), COLEPTERA: CURCULIONIDAE

Del Sarto, R. P.¹, Cruz, C.C.M. da¹, Teixeira, F. R.¹; Bezerra, I. C.³; Silva, M.C.M.¹; Grossi-de-Sá, M.F.^{1,2}
¹EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia; ²UCB - Universidade Católica de Brasília; ³EMBRAPA Hortaliças.

rafaelpds@pop.com.br

RESUMO

O bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis*) é uma das principais pragas da cultura do algodão, ocasionando perdas significativas devido ao hábito endofítico das larvas. Os botões florais e as maçãs do algodoeiro são os órgãos preferencialmente atacados pelos insetos, tanto para alimentação quanto para oviposição, dificultando seu controle pelo uso de inseticidas. Entre as proteínas vegetais relacionadas aos mecanismos de defesa das plantas, os inibidores de α -amilases são conhecidos por suas distintas especificidades para insetos-praga. O bicudo utiliza α -amilases intestinais para digerir o amido presente nas partes das plantas ingeridas. O presente trabalho teve por objetivo selecionar variantes de inibidores de α -amilase (α -AI) com afinidade para α -amilases do bicudo do algodoeiro, a partir de uma biblioteca combinatória de genes codificadores para mutantes de inibidores de α -amilase, obtidos por meio da recombinação entre os inibidores α -AI1 e α -AI2, isolados de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris*). Para tanto, α -amilases do bicudo do algodoeiro (AGA) foram parcialmente purificadas e utilizadas em experimentos de *biopanning*. Além disso, uma α -amilase do inseto, *Agamy12* foi expressa em levedura *Pichia pastoris* e utilizada para análise da atividade dos variantes selecionados. Foi possível selecionar vinte e seis variantes com afinidade para AGA apresentando distintas mutações. Cinco variantes selecionados para AGA foram utilizados para transformação de *Arabidopsis thaliana*, que foi capaz de expressar os α -AIs na forma ativa. Estes variantes foram capazes de inibir a atividade amilásica de AGA *in vitro*. As estratégias de DNA *shuffling* e *Phage Display* foram eficientes para a seleção de inibidores para α -amilases do bicudo do algodoeiro, disponibilizando novos genes com potencial para o controle do bicudo. Após a análise da toxicidade *in vivo*, estes inibidores poderão ser utilizados em programas de melhoramento vegetal utilizando-se a transgenia.

INTRODUÇÃO

A produção de algodão (*Gossypium hirsutum* L.r. *latifolium* Hutch.) no Brasil tem uma posição de destaque, colocando o país na cotonicultura internacional como 5º maior produtor, com participação de aproximadamente 5% da safra mundial. A receita de R\$ 2 bilhões movimentada por ano e a geração de empregos diretos e indiretos demonstram a importância desta cultura para a economia nacional. Estima-se que cerca de 3,7 milhões de toneladas de algodão em caroço serão colhidos neste ano (IBGE, 2007). Entretanto, a cotonicultura é susceptível ao ataque de vários insetos-praga (GALLO *et al.*, 1988). O ataque de insetos-praga é um dos principais motivos da redução da produtividade e lucratividade do cultivo do algodoeiro. Um destes insetos é o bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis* - Coleoptera: Curculionidae, Boheman, 1943), que se destaca entre os principais causadores de prejuízos porque ataca as estruturas reprodutivas da planta. Os insetos adultos se alimentam dos botões florais e das maçãs, onde também ovipositam. As larvas eclodem e entram nestas estruturas, completando seu desenvolvimento endofiticamente. As estruturas reprodutivas do algodoeiro protegem as larvas e as pupas da ação dos inseticidas, dificultando o controle deste inseto-praga por meio de métodos convencionais. O inseto utiliza enzimas digestivas para assimilar os nutrientes de sua dieta, entre os quais o amido presente nas estruturas preferencialmente atacadas, ocasionando a queda dos botões florais, flores e maçãs (BELLETTINI *et al.*, 1998). OLIVEIRA-NETO *et al.* (2003) detectou atividade de α -amilases (E.C. 3.2.1.1) no intestino de larvas e insetos adultos e clonou dois genes de α -amilases (*Amylag1* e 2) a partir do cDNA de larvas. Desta forma, existe a possibilidade de se utilizar como estratégia de controle os inibidores de α -amilases efetivos contra as enzimas presentes no lúmen intestinal do bicudo do algodoeiro. Os inibidores de α -amilases do tipo lectina são os mais caracterizados quanto à atividade e especificidade, sendo obtidos a partir de diversas cultivares de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*). Os mais estudados são o α -AI1 e α -AI2, que têm 78% de identidade de aminoácidos e exibem diferentes especificidades. O α -AI1 inibe a α -amilase pancreática de porco (PPA), da salivar humana (HSA) e dos bruquídeos *Callosobruchus maculatus* (CMA) e *Callosobruchus chinenses* (CCA). O α -AI2 inibe a α -amilase do *Zabrotes subfasciatus* (ZSA) (ISHIMOTO & KITAMURA, 1989; SUZUKI *et al.*, 1993; ISHIMOTO & CHRISPEELS, 1996; GROSSI DE SÁ *et al.*, 1997a,b). Contudo, nenhuma atividade destes inibidores foi detectada para α -amilases do bicudo do algodoeiro (AGA).

A estrutura do complexo do α -A11/ α -amilase do inseto *Tenebrio molitor* (TMA) demonstrou que os resíduos 29-46 e 171-189 se inserem no sítio ativo, impedindo a ligação do substrato e formando várias pontes de hidrogênio com os resíduos do sítio de ligação ao substrato. Em adição, os resíduos Tyr186 e Tyr37 se ligam fortemente aos resíduos da fenda catalítica. As interações com os resíduos da fenda catalítica são conservadas, e poucas modificações ocorrem nas interações proteína-proteína entre as diferentes amilases e o inibidor (BOMPARD-GILLES *et al.*, 1996; NAHOUM *et al.*, 1998, SILVA *et al.*, 2000, 2004). Com o objetivo de gerar moléculas de inibidores de α -amilase ativos contra AGA, foram selecionados inibidores de α -amilases contra α -amilases do inseto, a partir de uma biblioteca combinatória gerada por DNA *shuffling*, usando-se os genes para inibidores α -A11 e 2, combinado à técnica de *Phage Display*. Os inibidores selecionados foram expressos em *Arabidopsis thaliana* e a atividade inibitória contra AGA foi detectada, demonstrando atividade inibitória na variação de concentrações de nanomolar.

MATERIAS E MÉTODOS

Obtenção de AGA para Phage Display

A partir de larvas do bicudo do algodoeiro de 3º instar de desenvolvimento, foram obtidos extratos protéicos. As α -amilases intestinais (AGA) foram purificadas por meio de cromatografia hidrofóbica (Phenyl-Sepharose CL-4B), de acordo com SILVA *et al.* (1999). As frações ativas foram reunidas e utilizadas para imobilizar poços na placa de ELISA durante a seleção dos mutantes de inibidores de α -amilases.

Seleção por afinidade de genes variantes para inibidores de α -amilases utilizando AGA (Biopanning)

Foram selecionados genes variantes para inibidores de α -amilases contra AGA a partir de uma biblioteca combinatória construída pela aplicação da técnica de DNA *shuffling*, utilizando-se os genes dos inibidores α -A11 e 2 de feijão comum (BARBAS III, *et al.*, 2001). Dos genes selecionados, 86 foram expressos em *E. coli* e imunodetectados pelo uso do anticorpo contra epitopo de hemaglutinina do vírus influenza (anti-HA). Destes, 31 foram seqüenciados e as seqüências analisadas.

Transformação de A. thaliana com genes variantes para inibidores de α -amilases

Cinco genes variantes (C3, C11, G4, E11 e A11), selecionados com padrões mutacionais diferentes, foram sub-clonados no plasmídeo pCAMBIA2300 (série pCAMBIA, Camberra, Austrália sob controle do promotor 35S dobrado do CaMV). Os plasmídeos resultantes foram utilizados para a transformação de plantas jovens de *A. thaliana* por meio de imersão do botão floral (CLOUGH e BENT, 1998). As plantas transformadas expressando os genes variantes dos inibidores de α -amilase foram usadas em ensaios *in vitro* para a detecção da atividade inibitória contra AGA.

Análise da Atividade Inibitória dos Inibidores de α -amilases selecionados para AGA

Extratos de plantas de *A. thaliana* expressando os inibidores selecionados foram utilizados como fonte de inibidor para a análise da atividade contra AGA. Os testes *in vitro* foram realizados em pH 6.0, previamente determinado como pH ótimo para as α -amilases do inseto, e mediu-se a liberação de açúcares redutores após a hidrólise do amido (BERNFELD, P. 1955).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A purificação via cromatografia hidrofóbica possibilitou o enriquecimento majoritário de uma α -amilase (AGA) de aproximadamente 43kDa, visualizado em SDS-PAGE e em zimograma. As frações ativas foram eluídas na concentração aproximada de 0,3M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Figura 1a). Esta fração de AGA enriquecida foi utilizada para seleção de inibidores de α -amilases variantes por *Phage Display*.

Durante o procedimento de seleção, 5 ciclos foram realizados até se obter a estabilização da população de fagos enriquecida. O enriquecimento, de aproximadamente 112 vezes, ocorreu no 3º ciclo (Figura 1b), no qual foi realizada a coleta do *pool* de fagos específicos mostrando afinidade para AGA (BARBAS III, *et al.*, 2001). Após o isolamento dos clones, 86 foram expressos na superfície do fago, e 31 imunodetectados e seus DNAs seqüenciados. As análises de seqüências indicaram o padrão mutacional dos variantes de inibidores de α -amilases selecionados por afinidade contra AGA (Figura 1c).

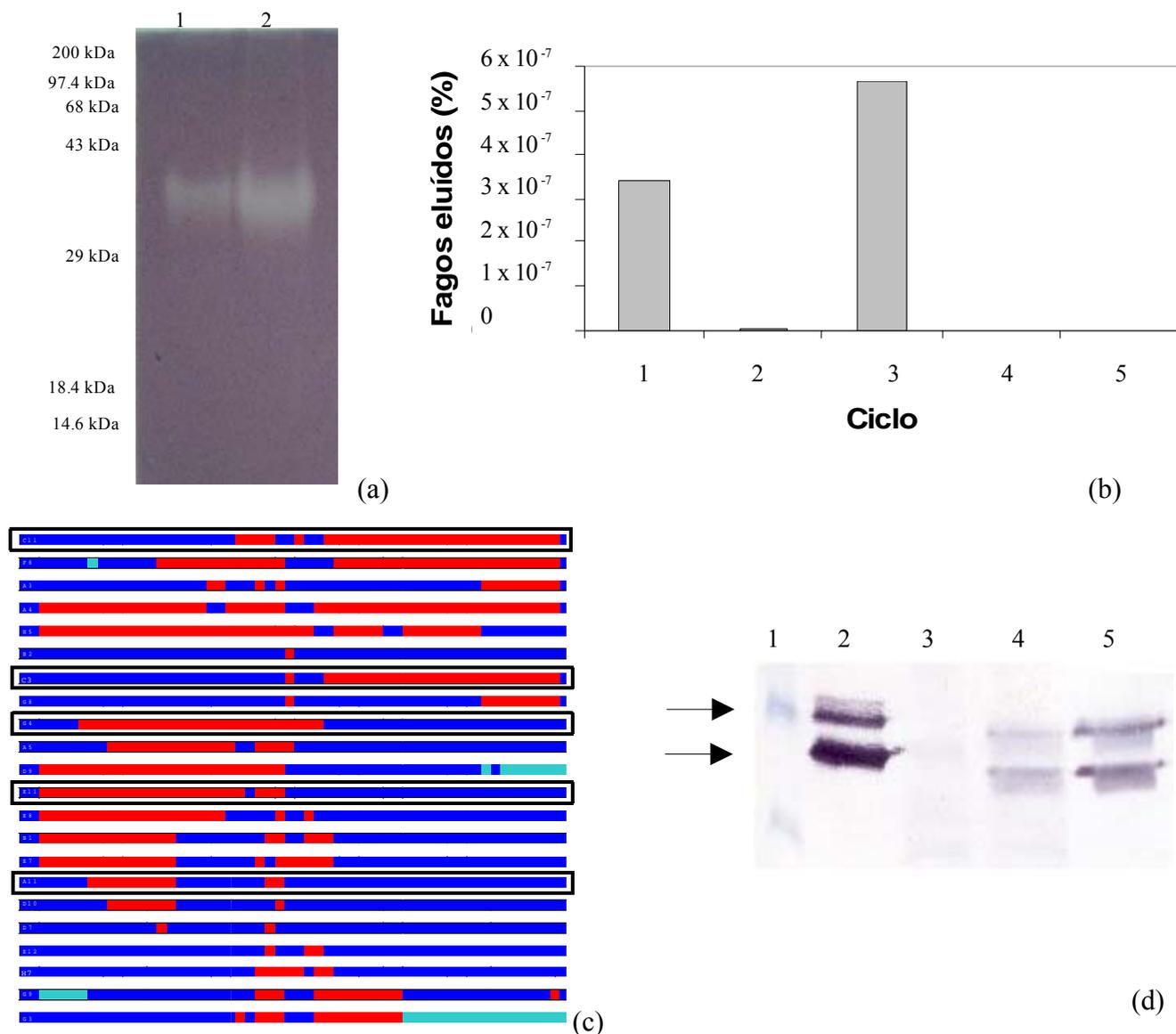


Figura 1: (a) Zimograma de atividade amilásica da fração purificada de AGA. 1: extrato intestinal, 2: AGA. (b) Monitoramento dos ciclos de seleção de fagos específicos afins da AGA. Contagem dos fagos eluídos durante o procedimento de *Phage Display*. Enriquecimento de 112 vezes no 3º ciclo. (c) Esquema ilustrativo de mutações encontradas nos inibidores de α -amilase variantes selecionados. Em azul aminoácidos correspondentes ao α -AI1, em vermelho ao α -AI2 e em turquesa seqüências diferentes dos genes parentais. As seqüências em caixa preta correspondem aos variantes utilizados para a transformação de *A. thaliana*. (d) Detecção da expressão dos inibidores variantes em *A. thaliana* (*Western Blot*). 1: α -AI1 purificado de feijão comum, 2: *A. thaliana* não transformada, 4 e 5: *A. thaliana* expressando os variantes C3 e A11, respectivamente.

Após a transformação de *A. thaliana* com os variantes C3, C11, A11, E11 e G4, a expressão dos inibidores foi avaliada, a fim de determinar se o sistema estava processando os inibidores para sua forma ativa. Os resultados observados via *Western Blot* confirmaram a presença, em plantas expressando os variantes C3 e A11, de duas subunidades, α e β , as quais constituem a molécula ativa do inibidor. Os testes de atividade inibitória utilizando-se o extrato de plantas de *A. thaliana* expressando os variantes C3, C11, A11 e E11 demonstraram que estes inibidores foram capazes de inibir AGA em concentrações de nanomolar (Tabela 1).

Tabela 1: Atividade inibitória dos variantes selecionados para AGA.

Variante	Concentração (nM)	Inibição (%)
C3	3.9	60,4
C11	11.7	56,7
E11	4.7	36,1
A11	4.9	75,5
α -A11	>10	1,3
α -A12	>10	1,8

Os variantes testados foram ativos contra AGA, sendo similar à inibição detectada para as α -amilases do *Cryptolestes ferrugineus* e *Tribolium castaneum*, em que 50% de inibição foi obtida com 10.9 e 4.2nM e 2.4 e 4.8nM de α -A11, em pH 4.5 e 6.0, respectivamente (KLUH *et al.*, 2005).

A estratégia de seleção de inibidores de α -amilases a partir de uma biblioteca combinatória possibilitou a detecção de inibidores com atividade inovada contra α -amilases do bicudo do algodoeiro.

PERSPECTIVAS

Atualmente, plantas dos inibidores selecionados estão sendo cultivadas para utilização em ensaios de atividade que visam a determinação do pH ótimo para formação do complexo enzima/inibidor. Em paralelo, os inibidores estão sendo purificados para serem usados em bioensaios. Novas plantas de *A. thaliana* estão sendo transformadas com os outros variantes selecionados e serão analisadas quanto à atividade inibitória correlacionada ao padrão mutacional obtido. Em acréscimo, os inibidores selecionados serão testados contra outros insetos-praga e insetos não-alvo, para a determinação da especificidade das novas moléculas selecionadas. Estes inibidores podem representar uma estratégia para o controle do bicudo do algodoeiro a partir de plantas de algodão geneticamente modificadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARBAS III, C.F.; BUSTON, D.R.; SCOTT, J.K.; SILVERMAN, G.J. Selection from Antibody Libraries. *In: Phage Display a Laboratory Manual*, Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, USA, p. 10.1-10.20, 2001
- BELLETTINI, S.; BELLETTINI, N.M.T.; SALVADOR, G.; MENDES, E.; GARCIA, E.C.; DA SILVA, W.G. Diferentes inseticidas do controle do bicudo do algodoeiro *Anthonomus grandis*-Bohemian 1843. CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, Res. 17, p.133, 1998.
- BOMPARD-GILLES, C.; ROUSSEAU, P.; ROUGEA, 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.
- CLOUGH, S. J.; BENT, A. F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, v.16, p.735-743, 1998.
- GALLO, D.; NAKANO, O; SILVEIRA NETO, S. *Manual de Entomologia Agrícola*, 2ªedição, Ed.Agronômica Ceres, São Paulo, 649 p, 1988.
- 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 -amilase cDNA and interactions of the expressed enzyme with bean amylase inhibitors. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v.27, p. 271-281, 1997.
- 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 Zoology*, v. 24, 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.11, p. 393-401, 1996.

KLUH I.; HORN M.; HYBLOVA J.; HUBERT J.; DOLECKOVA-MARESOVA L.; VOBURKA, Z.; KUDLIKOVA I.; KOCOUREK F.; MARES, M. Inhibitory specificity and insecticidal selectivity of alpha-amylase inhibitor from *Phaseolus vulgaris*. **Phytochemistry**, v. 66, n. 1, p.31-39, 2005.

NAHOUM, V.; FARISEI, F.; LE-BERRE-ANTON, V.; EGLOFF, M.P.; ROUGE, P.; POERIO, E.; PAYAN, F. A plant-seed inhibitor of two classes of alpha-amylases: X-ray analysis of *Tenebrio molitor* larvae alpha-amylase in complex with the bean *Phaseolus vulgaris* inhibitor. **Acta Biologica Crystalization D**, v.55, p. 360-362, 1998.

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, M. F. 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**, v. 22, n. 1, p. 77-87, 2003.

SILVA, C.P.; TERRA, W. R.; XAVIER-FILHO, J.; GROSSI DE SÁ, M.F.; LOPES, A. R.; PONTES, E. G. Digestion in larvae of *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) with emphasis on α -amylases and oligosaccharidases. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.29, p. 355–366, 1999.

SILVA, M.C.M.; 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 -amylases and their inhibitors. **Protein Engineering**, v. 13, n. 3, 167-177, 2000.

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

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

NOVA TOXINA CRY8 COM ATIVIDADE ENTOMOTÓXICA PARA O BICUDO DO ALGODOEIRO

(*Anthonomus grandis*)

Ramos, H.B.^{1,3}; Oliveira, G.R.^{1,4}; Brunetta, P.S.F.^{1,2}; Barbosa, A.E.A.D.^{1,2}; Figueira, E.L.Z.¹; Silva, M.C.M.¹; Grossi-de-Sá, M.F.^{1,2}

¹EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia; ²UCB – Universidade Católica de Brasília; ³UNB – Universidade de Brasília; ⁴UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
hudsonbatistamos@yahoo.com.br

RESUMO

Entre os insetos-praga que atacam a planta do algodão, o bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis*) se destaca como a praga mais agressiva e de difícil controle, devido ao seu hábito endofítico no estágio larval. Proteínas Cry têm sido utilizadas com sucesso como alternativa no controle de insetos-praga. O presente trabalho teve como objetivo gerar duas bibliotecas de variantes de um gene *cry8Ha*, recentemente isolado de uma cepa de *Bacillus thuringiensis*. As bibliotecas de variantes do gene *cry8Ha* foram desenvolvidas utilizando-se as técnicas *DNA shuffling* e *Phage display*. A população de genes recombinados foi clonada no fagomídeo pCOMB3xss, gerando 10⁵ genes variantes. Os novos genes selecionados foram seqüenciados e as proteínas codificadas por estes genes foram testadas em bioensaios contra larvas neonatas do inseto alvo (*A. grandis*). Os resultados mostraram um grande número de variantes com alta atividade entomotóxica quando comparado com a proteína original Cry8Ha1. Os genes codificando para os quatro mutantes mais ativos foram utilizados na construção de uma segunda biblioteca, gerando, desta forma, um número de novas toxinas com alta atividade contra o bicudo do algodoeiro.

INTRODUÇÃO

A cotonicultura está entre as dez principais culturas do país, com uma estimativa de produção, para o ano de 2007, de 3,7 milhões de toneladas (CONAB, 2007), sendo os estados do Mato Grosso, Goiás e Bahia os principais produtores. O algodoeiro tem numerosas glândulas nectárias, as quais são responsáveis pela produção de uma secreção líquido-resinosa e açucarada que exerce forte atração a insetos, incluindo insetos-praga. Dentre estes, destacam-se o 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 (*Spodoptera frugiperda*), causadores de grandes perdas de produção.

O bicudo-do-algodoeiro, foco deste trabalho, é considerado uma das pragas mais prejudiciais à cultura do algodão, sendo seu controle pelo uso de inseticidas químicos oneroso e ineficiente, devido ao hábito endofítico desse patógeno na fase larval. O desenvolvimento de plantas resistentes, por meio de transgenia, mostra-se como uma alternativa para auxiliar no controle de insetos.

Neste contexto, destacam-se as proteínas Cry, toxinas produzidas pelo *Bacillus thuringiensis* (Bt) durante a fase de esporulação, as quais apresentam atividade entomotóxica contra determinadas classes de insetos. As proteínas Cry, sob a forma de protoxinas, são clivadas por proteinases do inseto susceptível, o que as torna ativas e capazes de se ligar a receptores presentes na membrana do intestino médio da larva. Como consequência, ocorre uma reorganização na estrutura da membrana, favorecendo a formação de poro e provocando um desequilíbrio iônico e osmótico que leva o inseto à morte (BRAVO, 2007).

Recentemente, o gene *cry8Ha1* foi caracterizado pelo nosso grupo como codificador da proteína Cry8Ha1, que é ativa contra o bicudo do algodoeiro. Este gene foi utilizado na geração de uma biblioteca combinatória, e quatro de suas moléculas variantes com maior atividade foram utilizadas para gerar outra biblioteca, por meio das técnicas *DNA shuffling* e *Phage display*. A técnica *DNA shuffling* é utilizada no processo de evolução molecular dirigida e consiste em gerar, a partir de um ou mais genes parentais originados de diferentes espécies, uma diversidade de genes homólogos contendo mutações pontuais. Os variantes gerados neste trabalho foram posteriormente selecionados pela técnica *Phage display* quanto à sua afinidade por receptores presentes na membrana do intestino (BBMVs – *Brush border membrane vesicles*) do inseto alvo. Desta forma, o presente trabalho objetivou o desenvolvimento de novas moléculas, a partir do gene *cry8Ha1*, com atividade inseticida melhorada e específica contra o inseto-praga *A. grandis*.

MATERIAL E MÉTODOS

Construção da biblioteca

Foi utilizado o gene *cry8Ha1* para a construção de uma biblioteca de genes recombinantes, aplicando a técnica *DNA shuffling* (STEMMER 1994; ZHAO *et al.*, 1998; VOLKOV *et al.*, 2000; COCO *et al.*, 2001). Este gene foi inicialmente amplificado via PCR, com oligonucleotídeos contendo sítio de restrição para a

enzima *Sfi* I. Após a amplificação, o gene foi digerido com a enzima *DNase* I e foram obtidos fragmentos com tamanhos de 30-50 pares de base. Os fragmentos obtidos na digestão foram submetidos a um ciclo de PCR, sem a presença de oligonucleotídeos. O produto desta PCR foi usado como molde em uma nova PCR, com presença de primers, gerando uma população de variantes. As novas moléculas foram digeridas com *Sfi* I e clonadas no vetor pCOMB3xss. Essa construção foi utilizada para transformar células de *Escherichia coli* XL1blue.

Seleção de variantes a partir da biblioteca

Os genes variantes foram previamente selecionados da biblioteca pelo método de *Phage display*, seguindo o protocolo descrito por BARBAS III *et al.* (2001) e utilizando como ligantes receptores de membrana do intestino (BBMVs) de *A. grandis*.

Bioensaio

Para realização dos bioensaios, os cultivos das proteínas mutantes expressas no capsídeo do fago são adicionados à dieta artificial (MONNERAT *et al.*, 1999), em que larvas neonatas do bicudo do algodoeiro são colocadas e se alimentam.

Sequenciamento dos genes selecionados

Os genes variantes que codificam para as proteínas que apresentaram toxicidade nos bioensaios foram seqüenciados utilizando-se seqüenciamento automático.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Por meio da combinação das técnicas *DNA shuffling* (figura. 01) e *Phage Display*, obteve-se uma biblioteca contendo 10^5 variantes. Durante a etapa de seleção, foi considerado o nível de afinidade na interação BBMVs/Cry após aumento exponencial do número de lavagens em cada ciclo de adição/eluição de fagos específicos. A quantidade de fagos eluídos em cada ciclo foi monitorada pela leitura da absorbância a 405nm (Figura. 02), que indicou o ciclo R-5 contendo um enriquecimento de fagos específicos. As colônias individualizadas deste ciclo de seleção foram analisadas via PCR de colônia e 30 variantes com o tamanho esperado do gene (~2000 pb) foram selecionados.

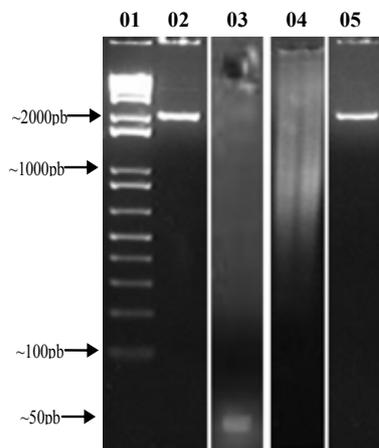


Figura 01. Etapas da técnica de *DNA shuffling*. **01**, marcador molecular 1KB Plus (Invitrogen); **02**, gene amplificado com *primer* para inserção do sítio da enzima de restrição *Sfi* I; **03**, fragmentos (30-50 pb) gerados pela enzima *DNase* I; **04**, produto da PCR sem adição de *primer*; **05**, novo ciclo de PCR com adição de *primer* no qual as variantes são geradas, a PCR anterior é utilizada como molde.

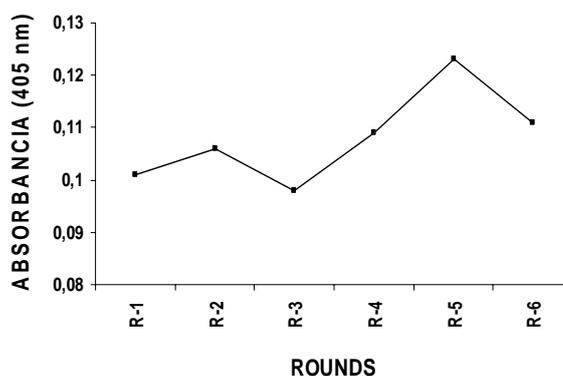


Figura 02. Fago Elisa demonstrando a interação entre receptores de membrana do intestino de larvas de *A. grandis* e fagos expressando as proteínas variantes. R-1, ciclo inicial (05 lavagens); R-2, 10 lavagens; R-03, 15 lavagens; R-4, 20 lavagens e R-5, 20 lavagens (enriquecimento da biblioteca na seleção); R-6, 25 lavagens.

As seqüências dos variantes selecionados foram comparadas com a do gene original utilizando alinhamento realizado pelo programa CLUSTAL W. O resultado das análises de seqüências confirmou a eficiência da técnica em gerar mutações (Figura 03).

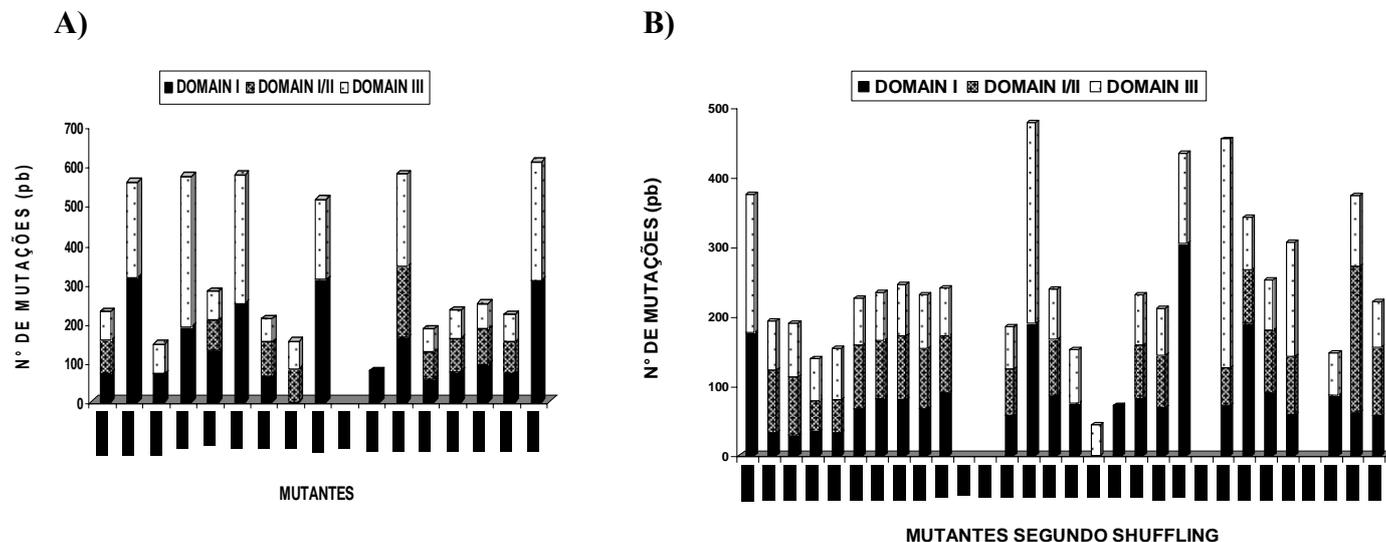


Figura 03. Número de mutações por variante. A porção preta se refere ao domínio I, a rachurada ao domínio II/III e a porção pontilhada ao domínio III. A) Seqüenciamento de mutantes primeiro *Shuffling* (BI-05/30). B) Seqüenciamento de mutantes segundo *Shuffling* (BII-01/30).

O resultado dos bioensaios, utilizando-se as 30 variantes pré-selecionadas viaxcx PCR de colônia, indicou mutantes com maior atividade entomotóxica em relação à Cry original. As moléculas que apresentaram maior atividade (BI-16, 18, 25 e 26) foram misturadas e recombinadas em outro ciclo de *DNA Shuffling*, objetivando o desenvolvimento de novas variantes, aumentando a diversidade gênica com potencial para uso no controle do bicudo do algodoeiro (Figura 04).

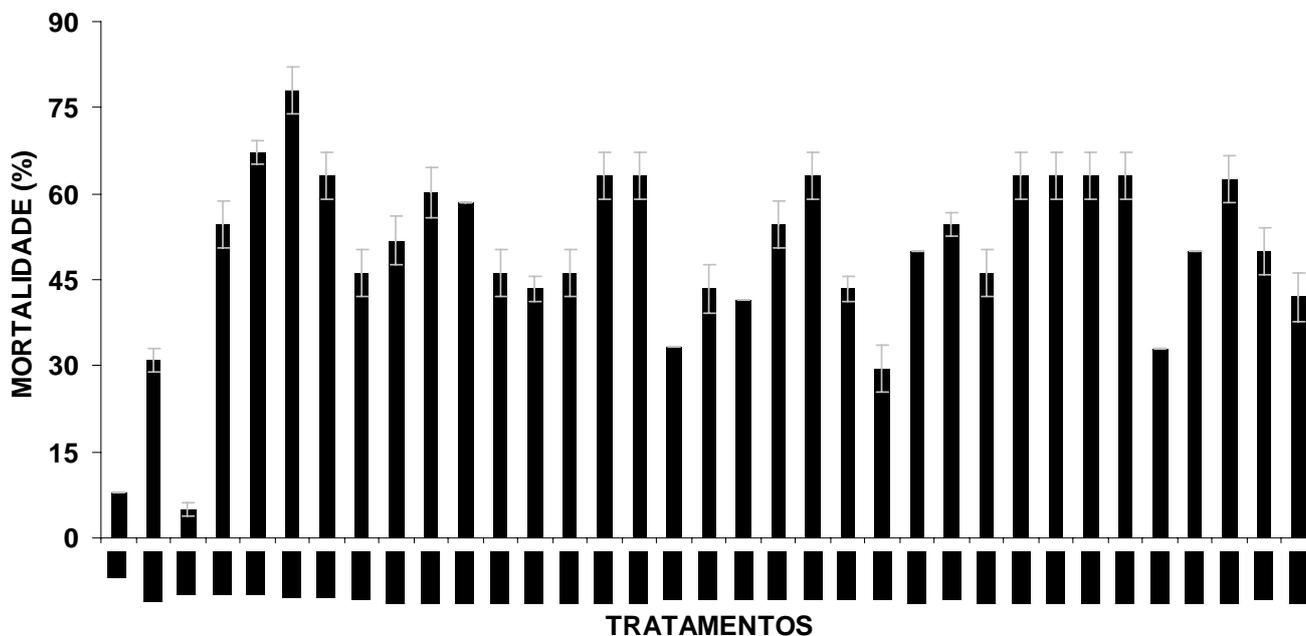


Figura 04. Bioensaio desafiando larvas neonatas de *A. grandis* contra proteínas mutantes codificadas pelas novas moléculas. C-, pCOMB3xss (vetor); CRY8, proteína original; DIET, dieta; BI-06, 18, 25 e 26, proteínas codificadas por variantes selecionados no primeiro *Shuffling* usados como substrato para o segundo *Shuffling*; BII-01/32, proteínas codificadas por variantes do segundo *Shuffling*. As larvas foram mantidas em dieta artificial por oito dias a 27° C, UR 70% e fotoperíodo de 12 horas.

Depois de vários bioensaios, o mutante BI-25, do primeiro *Shuffling*, foi selecionado por conferir maior atividade tóxica – cerca de 80% de mortalidade – para as larvas neonatas de bicudo do algodoeiro. Esta nova molécula foi subclonada no sistema de expressão GATEWAY (INVITROGEN), visando uma maior expressão, bem como a obtenção de proteína pura, já que o sistema permite a purificação utilizando-se resina com afinidade por cauda de histidina.

PERSPECTIVAS

Após a expressão e a purificação da toxina BI-25, obtida pelo sistema Gateway, espera-se conseguir quantidade necessária para determinação da LC 50 e realização dos testes de especificidade. Em paralelo, o gene *BI-25* tem sido utilizado no desenvolvimento de construções gênicas para serem utilizadas na transformação de plantas de algodão.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARBAS III, C. F.; BUSTON, D.R.; SCOTT, J.K.; SILVERMAN, G.J. Selection from Antibody libraries. In Phage Display a laboratory Manual. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, USA, p. 10.1-10.20, 2001.
- BRAVO, A.; GILL, S.; SOBERÓN, S. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon** (2007) *In press*.
- 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.
- COSTA, S. R. and BUENO, M. G. A saga do algodão: das primeiras lavouras à ação na OMC. Rio de Janeiro: Insight Engenharia, 2004, 144p. <http://www.conab.gov.br>, acessado em 05/05/2007.
- 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.
- 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 in Enzymology**, v.328, p.456-463, 2000.
- 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.

ATIVIDADE INSETICIDA DE UMA NOVA PROTEÍNA CRY PARA A LAGARTA DO CARTUCHO (*Spodoptera frugiperda*)

Oliveira, G.R.^{1,4}; Ramos, H.B.^{1,3}; Brunetta, P.S.F.^{1,2}; Barbosa, A.E.A.D.^{1,2}; Figueira, E.L.Z.¹; Silva, M.C.M.¹; Grossi-de-Sá, M.F.^{1,2}

¹EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia; ²UCB – Universidade Católica de Brasília; ³UNB – Universidade de Brasília; ⁴UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
gustavo@cenargen.embrapa.br

RESUMO

Bacillus thuringiensis é uma bactéria gram-positiva que produz cristais protéicos durante a fase de esporulação. Os cristais formados por proteínas Cry apresentam atividade tóxica específica para determinadas classes de insetos-praga, sendo o seu uso bastante difundido na agricultura. Neste contexto, o presente trabalho tem por objetivo gerar variantes da proteína Cry8Ha1 e selecionar moléculas tóxicas para a lagarta do cartucho (*Spodoptera frugiperda*), um dos principais insetos-praga de plantas de algodão. Foram geradas duas bibliotecas com 10⁵ variantes que apresentam mutações pontuais em toda a sua estrutura. Entre as diferentes moléculas geradas, o mutante SI-09 foi selecionado por apresentar mais de 70% de atividade inseticida sobre larvas de 1^o instar de *S. frugiperda*, bem como por afetar o desenvolvimento das larvas sobreviventes, acarretando até 97% de redução no seu peso.

INTRODUÇÃO

A cotonicultura vem desempenhando um importante papel sócio-econômico e está entre as dez principais culturas no Brasil. Estados das regiões Centro-Oeste e Nordeste vêm se destacando pelo aumento da área plantada, bem como pela tecnologia implantada no setor (COSTA, 2004). A estimativa da CONAB para 2007 é que o Brasil tenha 1,07 milhão de hectares de área cultivada, superior à da safra anterior em 24,4% (209,1 mil hectares), com uma produção nacional de algodão em caroço de 3,7 milhões de toneladas, da qual a região Centro-Oeste participa com 64,6%.

Esta importante cultura sofre ataques constantes de diferentes pragas, devido a estruturas denominadas de nectários, os quais produzem uma substância açucarada que exerce forte atração a insetos. Dentre os insetos-praga, destaca-se a lagarta do cartucho (*Spodoptera frugiperda*), inseto que apresenta hábito endofítico, penetrando no botão floral da planta do algodão, destruindo este órgão e tornando oneroso e ineficiente o seu controle por meio de pesticidas agrícolas. Logo, uma alternativa para auxiliar no controle de insetos-praga que vem tendo seu uso bastante difundido é a transgenia de plantas.

Neste contexto, destacam-se as proteínas Cry, endotoxinas produzidas pelo *Bacillus thuringiensis* (Bt), ativas contra determinadas classes de insetos (CRICKMORE *et al.*, 1998). Estas proteínas são formadas por três domínios: o domínio I, responsável pela formação do poro no intestino médio do inseto susceptível; o domínio II, responsável pela especificidade; e o domínio III, responsável, principalmente, pela estabilização da estrutura, com potencial envolvimento na formação do poro e especificidade (BRAVO, 2007).

Recentemente, foi isolado pelo nosso grupo um gene *cry* denominado *cry8Ha1* (Quezado *et al.*, em preparação). Este gene foi utilizado no desenvolvimento de moléculas bioativas contra *S. frugiperda* pela aplicação da técnica *DNA Shuffling*, na qual o gene é submetido à fragmentação aleatória e, depois, a ciclos de PCR que geram mutações pontuais. O produto resultante da recombinação gerou uma biblioteca de 10⁵ variantes da toxina apresentados na superfície de fagos filamentosos. Os mutantes gerados foram selecionados pela técnica de *Phage display*, utilizando-se como ligante receptores de membrana do intestino (BBMVs - *Brush border membrane vesicles*) do inseto alvo, a lagarta-do-cartucho.

Desta forma, este projeto teve por objetivo selecionar moléculas ativas e específicas para *S. frugiperda*. Os clones selecionados foram seqüenciados e as toxinas mutantes foram testadas em bioensaios contra larvas de 1^o instar da lagarta-do-cartucho, demonstrando alta eficiência das técnicas utilizadas na geração e seleção de novos genes.

MATERIAL E MÉTODOS

Construção da biblioteca

Foi utilizado o gene *cry8Ha1* para a construção de uma biblioteca de genes recombinantes, por meio da técnica *DNA Shuffling* (STEMMER 1994; ZHAO *et al.*, 1998; VOLKOV *et al.*, 2000; COCO *et al.*, 2001). Este gene foi inicialmente amplificado via PCR com um oligonucleotídeo contendo sítio de restrição para a enzima *Sfi* I. Após a amplificação, o gene foi digerido com a enzima *DNase* I, gerando fragmentos com tamanhos de 30-50 pares de base. Os fragmentos obtidos na digestão foram submetidos a um ciclo de

PCR, sem a presença de oligonucleotídeos. O produto desta PCR foi usado como molde em uma nova PCR, com presença de primers, dando origem aos variantes (Figura. 01). As novas moléculas foram digeridas com *Sfi* I, inseridas no vetor pCOMB3xss e utilizados para transformar *Escherichia coli* XL1blue.

Seleção dos variantes

Os mutantes obtidos foram selecionados pelo método de *Phage Display*, segundo protocolo descrito por BARBAS *et al.* (2001), utilizando-se como ligantes receptores de membrana do intestino (BBMVs) de *S. frugiperda*.

Bioensaio

As proteínas variantes, expressas em fagos, foram adicionadas à dieta artificial e testadas contra larvas 1º instar de *S. frugiperda*;

Seqüenciamento dos genes selecionados

Os genes selecionados foram parcialmente seqüenciados utilizando-se seqüenciamento automático.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi construída uma biblioteca, combinando as técnicas *DNA shuffling* e *Phage Display*, que resultou em 10⁵ variantes para o gene *cry8Ha1* (Figura. 01). Estas novas moléculas foram selecionadas por *Phage display*, usando-se como ligante proteínas de membrana do intestino (BBMVs) da *S. frugiperda*, receptores das proteínas Cry. Durante os ciclos de seleção, a interação BBMVs/Cry foi considerada para a obtenção de fagos específicos após sucessivas lavagens, com aumento exponencial em cada ciclo. O monitoramento de fagos eluídos em cada ciclo foi realizado pela leitura da absorbância a 405nm. O quinto ciclo mostrou um aumento no número de fagos eluídos, sugerindo um enriquecimento de fagos específicos (Figura. 02).

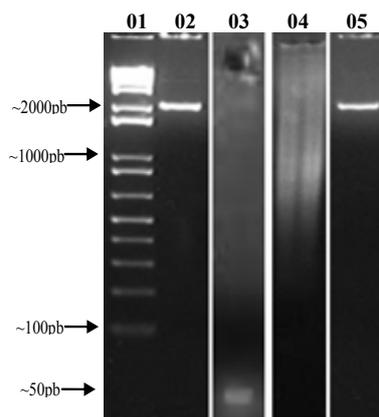


Figura 01. Etapas da técnica, *DNA SHUFFLING*. **01**, marcador molecular 1 Kb Plus (Invitrogen); **02**, gene amplificado com *primer* para inserção do sítio da enzima de restrição *Sfi* I; **03**, fragmentos (30-50 pb) gerados pela enzima *DNase* I; **04**, produto da PCR sem adição de *primer*; **05**, novo ciclo de PCR com adição de *primer* as variantes são geradas, a PCR anterior é usada como molde.

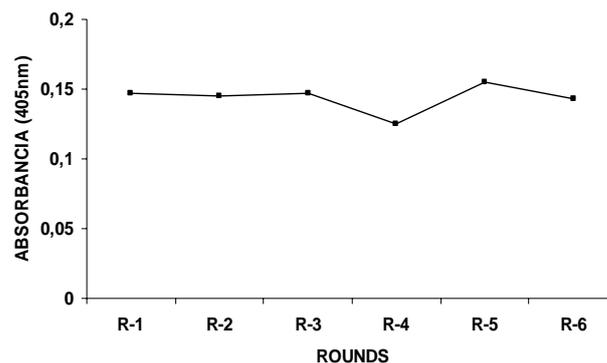


Figura 02. Resultado do teste de Fago Elisa demonstrando interação entre receptores de membrana do intestino de larvas de *S. frugiperda* e fagos expressando as proteínas variantes. R-1, ciclo inicial (05 lavagens); R-2, 10 lavagens; R-3, 15 lavagens; R-4, 20 lavagens; R-5, 20 lavagens (enriquecimento da biblioteca na seleção); R-6, 25 lavagens.

Os mutantes utilizados nos testes de PCR e bioensaios foram selecionados do ciclo R-5, porque este ciclo indica um maior enriquecimento da biblioteca. O DNA coletado do ciclo R-5 contendo um *pool* de novas moléculas foi utilizado para transformar células de *E.coli*. As colônias foram crescidas e individualizadas em placas contendo meio LB sólido e Ampicilina (100µg/mL), sendo posteriormente confirmada a presença do variante de ~2000pb (gene *cry8Ha1* recombinado) por PCR de colônia. Os variantes pré-selecionados por PCR foram expressos no capsídeo viral do fago VCSM13 e analisados quanto à toxicidade em bioensaios utilizando larvas de 1º instar da lagarta do cartucho (Figura. 03). Resultados preliminares mostram seis moléculas com atividade entomotóxica elevada, sendo o clone SI-09 o que apresentou maior toxicidade, de aproximadamente 70%.

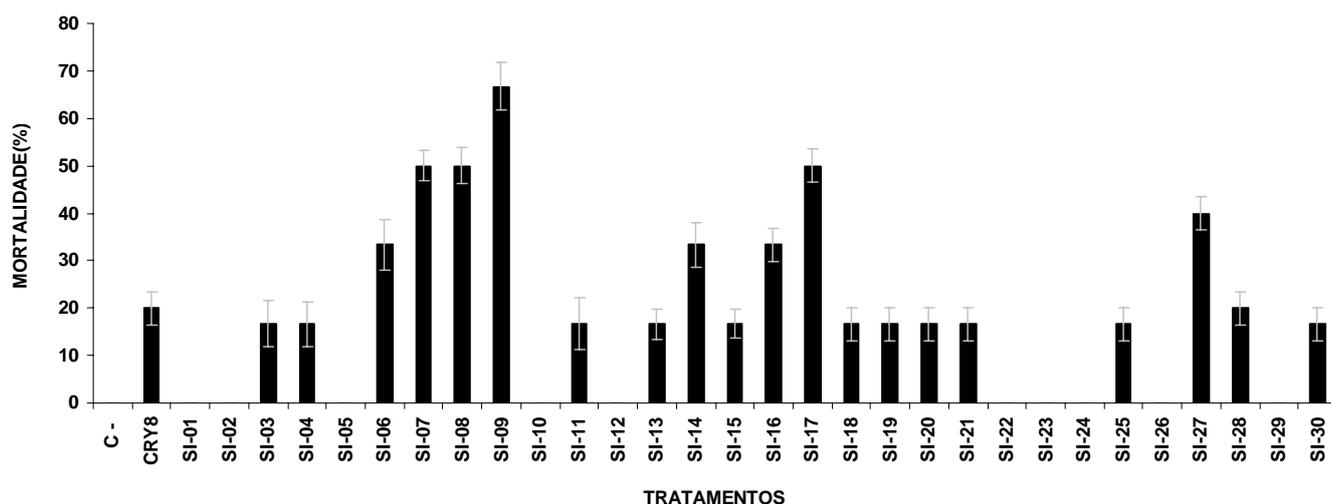
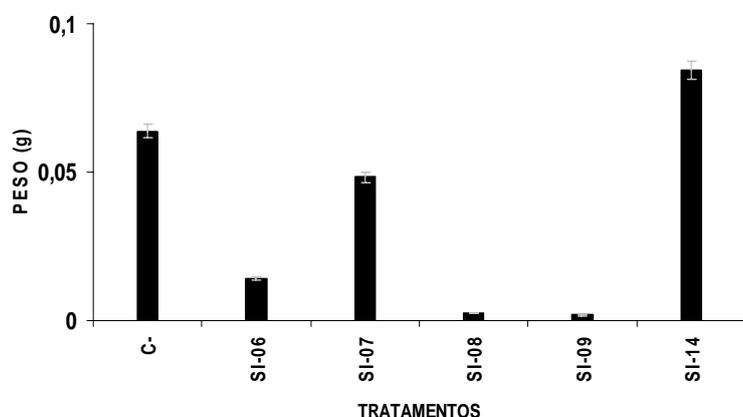


Figura 03. Avaliação da atividade inseticida, *in vitro*, das novas toxinas Cry geradas e selecionadas contra *S. frugiperda*. As larvas foram crescidas em dieta artificial durante um período de sete dias e sete noites com uma umidade relativa de 70%, a 27° C e fotoperíodo de 12 horas. C-, vetor pCOMB3xss; CRY-8, proteína Cry8Ha1; SI-01 a 30, proteína codificada pelos mutantes pré-

No sétimo dia do bioensaio foi realizada a pesagem das larvas sobreviventes, sendo que a toxina mutante SI-09 apresentou redução do peso em até 97% (Figura. 04).

A)



B)

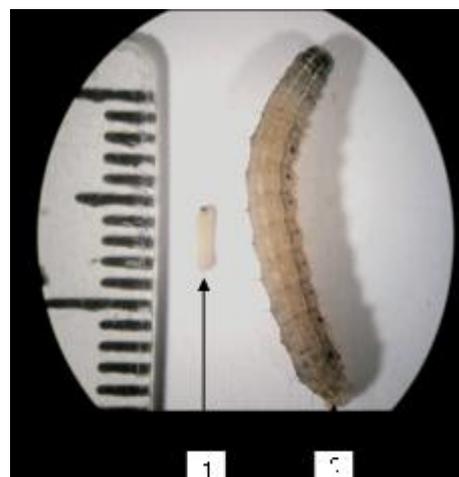


Figura 04. Influência das novas toxinas Cry8 sobre o desenvolvimento de larvas de *S. frugiperda*. **A.** Avaliação do ganho de peso das larvas; C-, vetor pCOMB3xss; SI-06, 07, 08, 09 e 14, proteína codificada pelos mutantes pré-selecionados por PCR. **B.** Avaliação do tamanho das larvas: (1) Larva sobrevivente após sete dias de tratamento com a proteína expressa pelo gene **SI-09** *cry8Ha1*, (2)

As novas moléculas já foram parcialmente seqüenciadas e apresentam mutações pontuais na estrutura primária. O mutante SI-09 foi submetido a um novo ciclo de *DNA Shuffling* e *Phage Display*, com o objetivo de gerar novas moléculas com alta atividade tóxica, bem como aumentar o número de variantes com potencial para o controle da lagarta do cartucho. Esta nova biblioteca se encontra em fase de análise quanto à varredura de toxicidade dos componentes selecionados.

PERSPECTIVAS

A variante selecionada será subclonada em um novo sistema de expressão que permitirá expressar e purificar a proteína recombinada. Desta forma, será possível calcular a LC 50 e realizar teste quanto à sua

especificidade. A nova toxina será empregada em programas de melhoramento de plantas do algodão para conferir resistência a *S. frugiperda*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARBAS III, C. F.; BUSTON, D.R.; SCOTT, J.K.; SILVERMAN, G.J. Selection from Antibody libraries. In Phage Display a laboratory Manual. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, USA, p. 10.1-10.20, 2001.
- BRAVO, A.; GILL, S.; SOBERÓN, S. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon** (2007) *In press*.
- 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.
- COSTA, S. R. and BUENO, M. G. **A saga do algodão: das primeiras lavouras à ação na OMC**. Rio de Janeiro: Insight Engenharia, 2004, 144p.
- <http://www.conab.gov.br>, acessado em 05/05/2007.
- 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.
- 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.
- 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.

EVOLUÇÃO *IN VITRO* DE MOLÉCULAS: SELEÇÃO DE VARIANTES CRY PARA INSETOS-PRAGA DO ALGODÃO E DA CANA-DE-AÇÚCAR

Gomes Júnior, J.E.^{1,2}; Craveiro, K.I.C.^{1,2}; Silva, M.C.M.¹; Grossi-de-Sá, M.F.^{1,3}

¹EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia; ²UnB - Universidade de Brasília; ³UCB - Universidade Católica de Brasília.

Jose_edilson@yahoo.com.br

RESUMO

O algodão e a cana-de-açúcar são culturas de grande relevância para a agricultura brasileira, com uma produção estimada de 2.240.400 e 475.730.000 de toneladas, respectivamente, para a safra 2006/2007. Os insetos-praga têm se mostrado como causadores de diversos danos a essas duas culturas. Dentre os insetos-praga, destacam-se o bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis*) Coleoptera: Curculionidae, e a lagarta do cartucho do milho (*Spodoptera frugiperda*) Lepidoptera: Noctuidae, para o algodoeiro; e a broca da cana (*Diatraea saccharalis*), juntamente com a broca gigante da cana (*Castnia licus*), para o canavial. Todos esses insetos-praga são de difícil controle porque sua fase larval se desenvolve no interior da planta, o que dificulta a ação dos inseticidas químicos. Este trabalho tem como objetivo gerar novos genes para proteínas entomotóxicas com alta toxicidade contra esses importantes insetos-praga, usando as técnicas *DNA Shuffling* e *Phage Display*. Para tanto, o gene original (*Cry1Ia12*) foi digerido usando-se *DNase I* e a recombinação dos fragmentos foi obtida por PCR em dois diferentes passos, gerando uma biblioteca contendo 10⁶ clones, para *A. grandis* e *C. licus*, e uma biblioteca com 10⁵ para *D. saccharalis*. As toxinas Cry variantes foram expressas na superfície de fagos e selecionadas contra receptores da membrana do intestino médio (B.B.M.V.) dos insetos. O quarto ciclo de seleção, para *A. grandis* e *C. licus*, e o quinto ciclo, para *D. saccharalis*, apresentaram o maior enriquecimento de fagos específicos, com 10⁵ clones, os quais foram selecionados com base em análises por PCR e Dot Blot, sendo encontrados quinze, sete e onze clones positivos para *A. grandis*, *C. licus* e *D. saccharalis*, respectivamente. Estas toxinas Cry variantes foram expressas e submetidas a bioensaios contra a larva de cada inseto-praga. Em relação a *S. frugiperda*, os experimentos estão em fase inicial. Esta estratégia mostrou ser eficiente para gerar e identificar genes com potencial para serem usados na transformação genética de algodoeiro e de cana-de-açúcar.

INTRODUÇÃO

Naturalmente, todas as células vivas passam por processos de diversificação, seleção e amplificação. Avanços recentes no campo da biologia molecular permitem mimetizar esses processos em nível molecular, envolvendo as funções das moléculas, sendo as proteínas, o DNA e o RNA os maiores alvos (MATSUURA & YOMO, 2006, WONG *et al.*, 2006).

A evolução molecular de proteínas consiste, principalmente, em dois passos: diversificação e seleção. A diversificação ocorre por meio da introdução de mutações pontuais, deleções ou recombinações nos genes que codificam as proteínas. Há vários métodos para a geração de bibliotecas mutantes, dentre os quais o *DNA Shuffling* (STEMMER, 1994, COCO *et al.*, 2001), utilizado neste trabalho, uma vez que possibilita a obtenção de grande quantidade de mutantes. Por sua vez, a seleção envolve diversas técnicas, como apresentação à superfície celular – que utiliza células como leveduras e *E. coli* (KONDO & UEDA, 2004, OLSEN *et al.*, 2000) – e ligação a proteínas fluorescentes (GFP, RFP), que relaciona a intensidade da fluorescência com a função (WAHLER & REYMOND, 2001), sendo a mais utilizada a apresentação de bibliotecas de mutantes em bacteriófagos (*Phage Display*), em que vários tipos de fagos (lambda, T7 e filamentosos) podem ser usados, sendo o sistema mais difundido o que utiliza o fago filamentosos M13 (SMITH, 1985).

Diferentes proteínas entomotóxicas são descritas com potencial uso no controle de insetos-praga (CARLINI & GROSSI-DE-SÁ, 2002; CHRISTOU *et al.*, 2006). As toxinas Cry são descritas como as mais promissoras por serem altamente tóxicas (ROMEIS *et al.*, 2006). Dentre os diferentes genes descritos para as toxinas Cry, utilizou-se neste trabalho o gene para a toxina *Cry1Ia12* (isolado da cepa S811 de *Bacillus thuringiensis* do Banco de Germoplasma da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia), o qual apresenta efeito contra *Spodoptera frugiperda* e *Anthonomus grandis*, com LC_{50s} de 230µg/mL e 5µg/mL, respectivamente, indicando uma necessidade de serem mais efetivos (MAGALHÃES, 2006; GROSSI-DE-SÁ, 2007).

Este trabalho visa selecionar genes para variantes de toxina Cry ativas contra os principais insetos-praga do algodoeiro e da cana-de-açúcar. As estratégias a serem utilizadas incluem o uso de técnicas moleculares, como *DNA Shuffling* e *Phage Display*, para a geração e seleção de variantes da toxina *Cry1Ia12*, que sejam altamente tóxicas aos principais insetos-praga do algodoeiro e do canavial.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção dos Insetos

Os insetos utilizados nesse estudo, em seus primeiros instares de desenvolvimento, foram obtidos por criações em dieta artificial, mantidas no Controle Biológico (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – Brasília/DF) e no Centro de Tecnologia Canaveira (CTC – Piracicaba/SP).

Extração das Proteínas Totais

Os intestinos completos das larvas no quarto estágio de desenvolvimento das pragas foram extraídos e armazenados a -80°C (WOLFERSBERGER *et al.*, 1987), a fim de evitar sua degradação, até a utilização na seleção de toxinas da biblioteca de *Phage Display*.

DNA Shuffling

O gene que codifica a proteína *Cry1Ia12* foi alinhado e comparado com outras seqüências presentes em bancos de dados, a fim de definir a região codificadora da proteína ativa que contém os três domínios. Também foram desenvolvidos oligonucleotídeos específicos para a amplificação das seqüências determinadas. Posteriormente, este gene foi recombinado por meio da tecnologia do *DNA Shuffling*, que compreende as seguintes etapas: (i) fragmentação dos genes amplificados com a enzima *DNase I*, cujos fragmentos obtidos apresentaram entre 30-50pb, (ii) recombinação aleatória dos fragmentos em reação de PCR sem a adição de oligonucleotídeos, (iii) amplificação dos genes em reação de PCR com oligonucleotídeos específicos contendo o sítio de restrição para a enzima *Sfi I*. Os novos genes foram digeridos com *Sfi I*, introduzidos no fagomídeo pCOMB3X, clonados em *E. coli* XL1 Blue, obtendo-se uma biblioteca combinatória de genes *Cry* mutantes com, no mínimo, 10^5 transformantes.

Phage Display

Phage Display é uma técnica utilizada para estudar interações macromoleculares, por permitir a exposição de proteínas e peptídeos na superfície na superfície de fagos filamentosos (SMITH, 1985). Tem sido utilizada para explorar a grande diversidade de mutantes, apresentados em bibliotecas combinatórias, expressando proteínas funcionais. Os genes provenientes do primeiro ciclo de *DNA Shuffling*, serão submetidos à seleção por *Phage Display* utilizando como ligantes os receptores da membrana do intestino das pragas do algodão.

Bioensaios com as variantes da toxina Cry

Os bioensaios serão conduzidos pela incorporação das toxinas *Cry* (original e variantes) na dieta artificial das pragas do algodão e da cana-de-açúcar. Os resultados da mortalidade das larvas serão utilizados na determinação da LC_{50} , a fim de selecionar as toxinas mais ativas a serem aplicadas posteriormente em programas de melhoramento genético do algodão e da cana-de-açúcar.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimentos foram realizados com o objetivo de gerar novos genes *Cry1Ia12* com potencial para serem utilizados na transformação do algodoeiro e do canavial, conferindo resistência a pragas-alvo. A estratégia adotada envolveu técnicas avançadas de mutagenese, como o *DNA Shuffling* (Figura 1) e a construção de bibliotecas combinatórias do tipo *Phage display* (Figura 2).

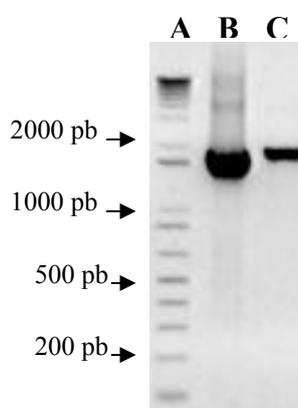


Figura 1: Gel de agarose (1%) mostrando o produto de recombinação do gene *Cry1Ia12*, após o *DNA Shuffling*. **A:** Massas moleculares – 1 Kb Plus Ladder, **B:** gene *Cry1Ia12* original, com peso aproximado de 2000 pb, **C:** População de genes variantes de *Cry1Ia12* resultante do *DNA Shuffling*.

O produto da técnica de *DNA Shuffling* foi digerido com a enzima *Sfi* I e inserido no fagomídeo pCOMB3XSS (RADER *et al.*, 2001). Células de *E. coli* XL1-Blue foram transformadas com esta construção e usadas na infecção com o fago auxiliar VCSM13. Desta forma, bibliotecas combinatórias foram apresentadas na superfície de fagos, segundo BARBAS *et al.*, 2001. A seleção dos variantes de genes *cry* foi realizada conforme a afinidade destas toxinas por proteínas (receptores) existentes nas BBMV (*Brush Border Membrane Vesicles*) do intestino dos insetos. O enriquecimento de fagos específicos foi identificado pelo título de fagos eluídos, monitorado após cada ciclo de seleção (BARBAS *et al.*, 2001). Assim, o quarto ciclo na seleção contra *A. grandis* e *C. licus* e o quinto ciclo da seleção contra *D. saccharalis* foram os que apresentaram maior quantidade de fagos enriquecidos.

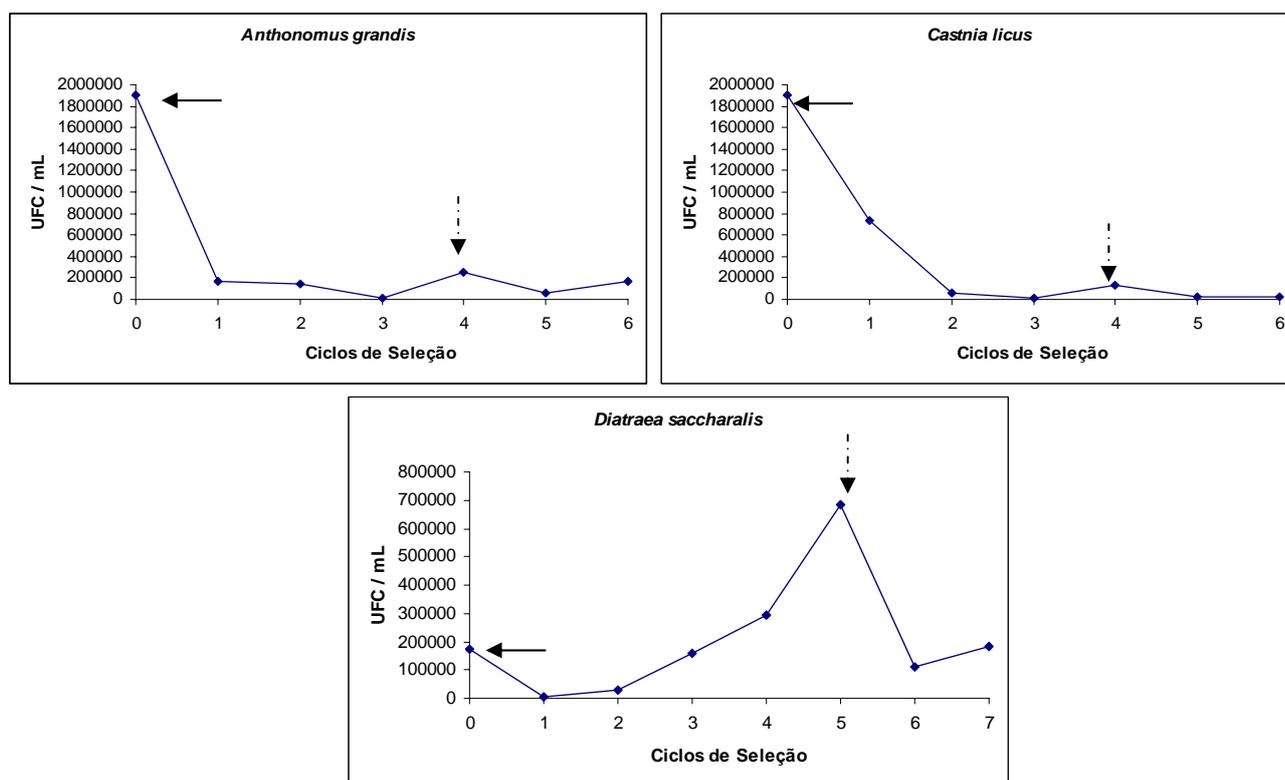


Figura 2: Gráficos representando a quantidade de bacteriófagos provenientes de cada ciclo de seleção do *Phage Display* – *A. grandis* (bicudo do algodoeiro), *C. licus* (broca gigante da cana-de-açúcar) e *D. saccharalis* (broca da cana). As setas contínuas representam os tamanhos iniciais das bibliotecas de mutantes para cada experimento ($1,9 \cdot 10^6$ mutantes, para *A. grandis* e *C. licus* e $1,75 \cdot 10^5$, para *D. saccharalis*). As setas tracejadas representam os ciclos nos quais houve os maiores enriquecimentos de bacteriófagos ($2,51 \cdot 10^5$, $1,29 \cdot 10^5$ e $6,84 \cdot 10^5$ mutantes, para *A. grandis*, *C. licus* e *D. saccharalis*, respectivamente) específicos para cada inseto-praga.

Após a seleção por *Phage Display*, 150 clones provenientes do ciclo de seleção no qual houve o maior enriquecimento de bacteriófagos para *A. grandis* e *C. licus*, e 90 clones para *D. saccharalis*, foram aleatoriamente replicados em placas de *Petri* contendo meio LB, ágar e antibiótico carbenicilina, na concentração final de $100 \mu\text{g/mL}$. Em seguida, cada colônia foi testada via PCR, objetivando detectar quais clones teriam o gene *Cry1Ia12* variante, de acordo com o tamanho do gene original (2000pb). Como resultado, 48 dos 150 clones de *A. grandis*, 14 dos 150 clones de *C. licus* e 29 dos 90 clones de *D. saccharalis* foram considerados positivos. Dentre estes, 15, 7 e 11, respectivamente, foram selecionados na expressão visualizada em Dot Blot.

PERSPECTIVAS

Os variantes selecionados contra as pragas em estudo serão expressos e testados em bioensaios. O objetivo é encontrar uma toxina *Cry* mutante com alta toxicidade e efetividade contra as pragas-alvo. Posteriormente, os genes serão seqüenciados e utilizados na construção de vetores para transformação de plantas de algodão e cana-de-açúcar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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**, p. 101-1020, 2001.
- CARLINI, C.R.; GROSSI-DE-SÁ, M.F. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. **Toxicon**, v.40, p.1515-1539, 2002.
- CHRISTOU, P.; CAPELL, T., KOHLI, A.; GATEHOUSE, J. A.; GATEHOUSE, A. M. R. Recent developments and future prospects in insect pest control in transgenic crops. **Trends in Plant Science**, Vol.11, n. 6, 302-308, 2006.
- 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.
- GROSSI-DE-SÁ, M. F.; MAGALHÃES, M. T. Q.; SILVA, M. S.; SILVA, S. M. B.; DIAS, S. C.; NAKASU, E. Y. T.; BRUNETTA, P. S. F.; OLIVEIRA, G. R.; OLIVEIRA-NETO, O.B.; OLIVEIRA, R.; SOARES, L.H.B.; AYUB, M. A. Z.; SIQUEIRA, H. A.; FIGUEIRA, E. L. Z. Susceptibility of *Anthonomus grandis* (cotton boll weevil) and *Spodoptera frugiperda* (fall armyworm) to a Cry1Ia-type toxin from a Brazilian *Bacillus thuringiensis* strain. **Journal Biochemistry Molecular Biology**. Aceito, 2007.
- KONDO, A.; UEDA, M. Yeast cell-surface display - applications of molecular display. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.64, p.28-40, 2004.
- MAGALHÃES, M. T. Q. Toxinas Cry: Clonagem de genes potenciais para o controle das pragas do algodoeiro, *Anthonomus grandis* e *Spodoptera frugiperda*. Dissertação de Mestrado. UFRGS, Porto Alegre, 2006.
- MATSUURA, T.; YOMO, T. *In Vitro* Evolution of Proteins – Review. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, vol. 101, n. 16, p.449-456, 2006.
- OLSEN, M.; IVERSON, B.; GEORGIU, G. High-throughput screening of enzyme libraries. **Current Opinion Biotechnology**, v.11, p.331-337, 2000.
- RADER, C.; STEINBERG, P.; BARBAS III, C. F. Selection from antibody libraries. In: **Phage Display – A Laboratory Manual – USA: Cold Spring Laboratory**, p.101-109, 2001.
- ROMEIS, J.; MEISSE,; BIGLER, F. Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins and biological control. **Nature Biotechnology**. vol. 24, n. 1, p.63-71, 2006.
- 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. Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. **Nature**, v.370, p.389-391, 1994.
- WAHLER, D.; REYMOND, J. L. Novel methods for biocatalyst screening. **Current Opinion in Chemical Biology**, v.5, p.152-158, 2001.
- WOLFERSBERGER, M. Preparation and partial characterization of amino acid transporting brush border membrane vesicles from the larval midgut of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, vol. 86, n. 2, p.301-308, 1987.
- WONG, T. S.; ZHURINA, D.; SCHWANEBERG, U. The Diversity Challenge in Directed Protein Evolution. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, vol. 9, n. 4, p.271-288, 2006.

CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE ENZIMAS PROTEOLÍTICAS INTESTINAIS DE LARVAS DE BROCA GIGANTE DA CANA, *Castnia licus* (DRURY)

Arboleda V. J. W.^{1,2}; Valencia-Jiménez, A.^{1,2,3}; Silva, M. S.⁴; Grossi-de-Sá, M. F.¹

¹EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF-Brasil; ²UnB - Universidade de Brasília, Brasília-DF, Brasil; ³Universidad de Caldas, Manizales, Colômbia; ⁴CPAC - Embrapa Cerrados, Planaltina-DF, Brasil. jwarboleda@gmail.com

RESUMO

A fim de caracterizar a atividade de proteases digestivas em larvas de *Castnia licus*, intestinos de larvas de último estágio foram embebidos em tampão adequado, homogeneizados, centrifugados e o sobrenadante contendo proteases intestinais de *C. licus* (extrato intestinal) foi coletado e congelado a -80° C até o uso. As atividades de quimotripsina e de tripsina do extrato intestinal foram determinadas por metodologias espectrofotométricas já descritas. Ensaio da atividade quimotripsina e de tripsina do extrato intestinal na presença de inibidores químicos foram feitos utilizando-se o inibidor PMSF (*Phenylmethanesulfonyl fluoride*). A atividade de leucina-aminopeptidase (LAP) foi medida utilizando-se um substrato sintético, em combinação com o cromóforo *Fast Black K*. Quanto à atividade de enzimas intestinais de larvas de *C. licus*, concluiu-se por meio dos presentes estudos que: (i) a atividade de tripsina representa 30% da atividade de quimotripsina, (ii) ambas as atividades de quimotripsina e tripsina foram 100% inibidas na presença de PMSF 2mM, (iii) a atividade de LAP é considerável e sua cinética de atividade é linear para os primeiros quatro minutos nas condições testadas e (iv) a atividade de LAP é uma função linear da quantidade de proteínas intestinais de larvas de *C. licus*. Portanto, as quimotripsinas e as LAPs intestinais de *C. licus* são alvos promissores para a busca de inibidores com potencial para controlar essa praga. Em ensaios futuros, a caracterização de atividade serina-proteases intestinais será também avaliada por zimogramas. A caracterização da atividade de cisteína-proteases intestinais será também realizada, a fim de avaliar quão promissoras são cisteína-proteases intestinais da larva como alvos de inibidores para o controle da praga.

INTRODUÇÃO

A broca gigante, *Castnia licus* (Drury), é um dos problemas entomológicos de maior importância na cultura da cana não apenas no Brasil, mas também em vários países da América Central e da América do Sul. As larvas se alimentam de raízes e rizomas dessa planta, afetando severamente a germinação de gemas e a produtividade. O controle químico desse inseto-praga é dificultado pela sua localização natural, dentro dos tecidos vegetais. A fim de explorar alternativas de controle da broca gigante da cana, faz-se necessário caracterizar em detalhes a atividade das enzimas digestivas presentes no intestino do inseto em sua fase larval, bem como as interações dessas enzimas com inibidores de sua atividade. Espera-se que sistemas complexos de proteólise, envolvendo tanto endoproteases (tripsina e quimotripsina) quanto exopeptidases (leucina-aminopeptidase), devem estar presentes no trato intestinal de larvas de *C. licus*. Como o repertório de enzimas digestivas de *C. licus* é desconhecido, estudou-se no presente trabalho a atividade proteolítica endógena do trato intestinal desse inseto na fase larval.

MATERIAL E MÉTODOS

Insetos

Larvas de *C. licus* foram coletadas em campos agrícolas de cana (*Sacharum officinarum* L.) na Região Nordeste do Brasil. As larvas foram mantidas em fragmentos de colmo de cana em câmara de crescimento.

Extratos intestinais

Para a caracterização de proteases de *C. licus*, tratos intestinais foram removidos de larvas e colocados em tampão de atividade. Os intestinos foram homogeneizados (1 intestino/200µL de tampão de atividade) e então centrifugados a 10.000g durante 30 minutos, e o sobrenadante foi estocado a -80° C até o uso.

Concentração protéica

A concentração de proteínas nos extratos intestinais foi medida de acordo com método de BRADFORD (1976). A albumina de soro bovino foi usada como padrão.

Ensaio de atividade de quimotripsina

O tampão de reação consistiu de Tris-HCl 0,5M pH 8.0 contendo CaCl₂ 0,68M e metanol 35%. Os ensaios enzimáticos foram realizados de acordo com SUK-HEEKANG e MORTON (1973). Uma unidade de atividade de quimotripsina foi definida como sendo o incremento de 0,01 na absorbância por minuto, a

36° C, sob as condições experimentais adotadas. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas, utilizando-se os devidos controles negativos.

Ensaio de atividade de tripsina

O tampão de reação consistiu de Tris-HCl 0,15M pH 8.1 contendo CaCl₂ 0,05M. Os ensaios enzimáticos foram realizados de acordo com SCHWERTZ e TAKENAKA (1955). Uma unidade de atividade de tripsina foi definida como sendo o incremento de 0,01 na absorbância por minuto, a 36° C, sob as condições experimentais adotadas. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas, utilizando-se os devidos controles negativos.

Ensaio de atividade de leucina-aminopeptidase (LAP)

A atividade de LAP foi medida utilizando-se o substrato sintético L-leucil-2-naftilamida. Para o ensaio enzimático, o substrato sintético e o cromóforo *Fast Black K* foram diluídos em tampão fosfato 100mM pH 7.0 contendo MgCl₂ 0,5mM. Misturam-se 200µL de 100mM pH 7.0 contendo MgCl₂ 0,5mM e 5µL de extrato intestinal (equivalente a 0.025g de intestino), pré-incubou-se a 36° C durante 15 minutos e adicionou-se 5µL de *Fast Black K* 24mM. As reações foram iniciadas pela adição de 5µL do substrato sintético L-leucil-2-naftilamida 14mM e incubação a 36° C durante 5 minutos no escuro. A atividade de LAP foi medida por monitoramento constante da absorbância a 590nm da reação, indicativa da taxa de formação de 2-naftilamina, liberada pela ação enzimática de LAP. O espectrofotômetro usado para a medição de absorbância a 590nm foi o Unicam UV2. Para todos os experimentos, três ensaios independentes foram feitos.

Substratos e inibidores de proteases

Atividade de serinaproteases foi testada utilizando-se o substrato BTEE (N-benzoil-tiretil éster) para proteases tipo quimotripsina e utilizando-se o substrato BAEE (N-benzoil-l-arginina etil éster) para proteases tipo tripsina. Ambas as proteases foram incubadas na presença do inibidor de proteases PMSF (*Phenylmethanesulfonyl fluoride*). Os substratos foram dissolvidos de acordo com as instruções do fabricante. O substrato BTEE foi usado na concentração final de 5mg/10mL de tampão de atividade (1.6mM), enquanto o substrato BAEE foi usado na concentração final de 5mg/500µL de tampão de atividade (0.03M). Cada ensaio foi realizado três vezes e a média das atividades proteolíticas estão apresentadas nas figuras.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Atividade de quimotripsina e tripsina

Os ensaios enzimáticos feitos com extratos intestinais de *C. licus* mostraram presença de atividade específica de quimotripsina da ordem de 255,70 unidades/mg de proteína e de atividade específica de tripsina da ordem de 73,90 unidades/mg de proteína (Figura 1A). A atividade endógena de tripsina de extratos intestinais de *C. licus* representa cerca de 30% da atividade endógena de quimotripsina digestiva do inseto. Ambas as atividades enzimáticas endógenas foram comparadas com a atividade de preparações de quimotripsina pura comercial contendo 436,30 unidades/mg de proteína (Figura 1B).

Efeito de inibidores de proteases in vitro

As atividades de quimotripsina e tripsina de extratos intestinais de larvas de *C. licus* foram testadas na presença de PMSF. Ambas as atividades de quimotripsina e de tripsina foram 100% inibidas pelo inibidor PMSF (dados não mostrados).

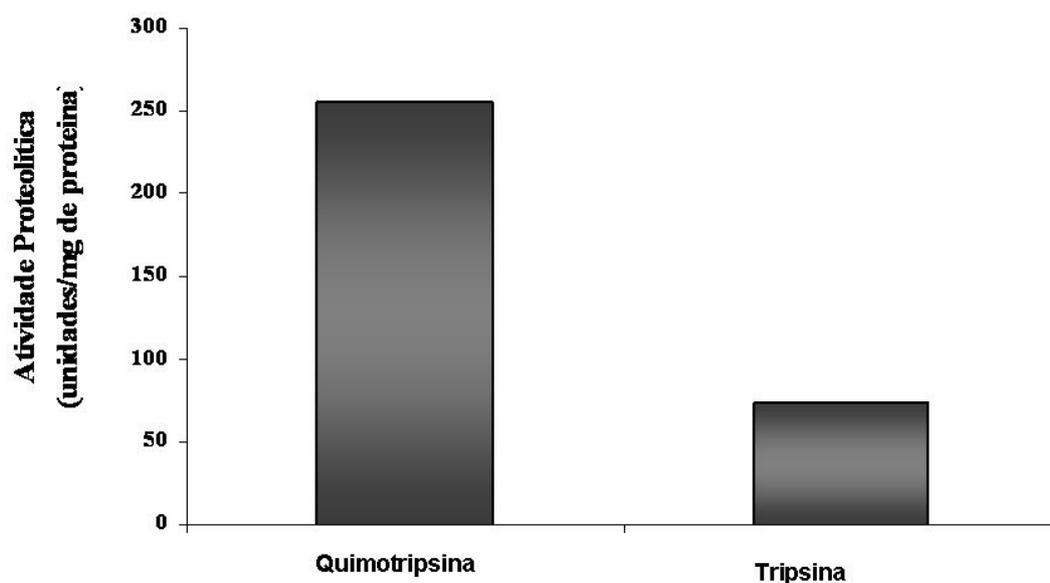
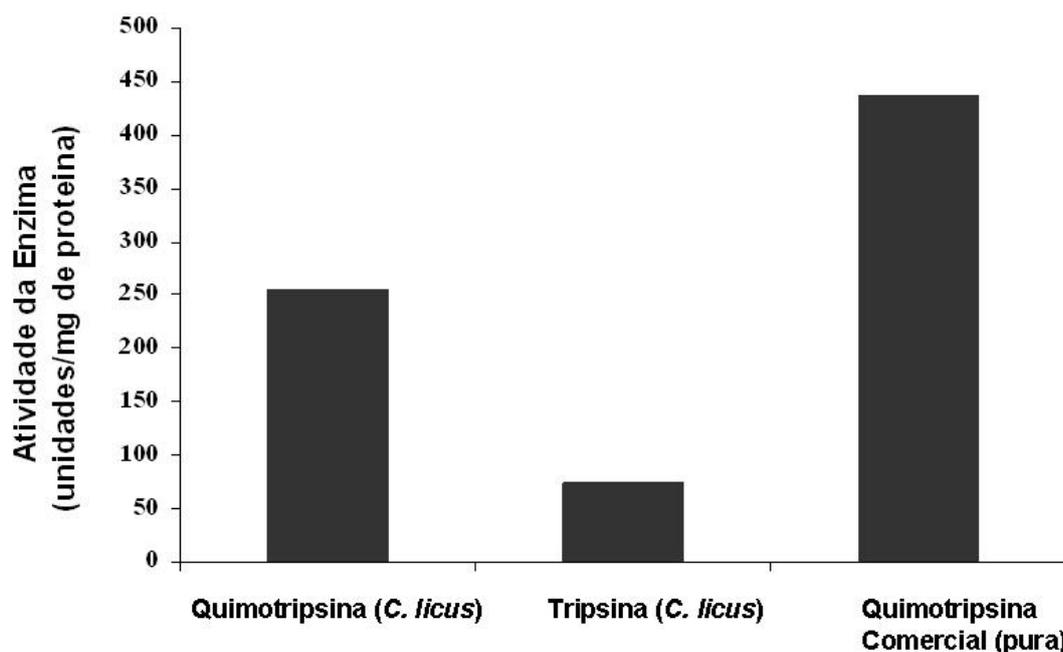
A**B**

Figura 1: Atividades específicas de quimotripsina e de tripsina. **A.** Atividades específicas de quimotripsina e de tripsina endógenas de extratos intestinais de larvas de *C. licus*. **B.** Atividades específicas de quimotripsina e de tripsina endógenas de extratos intestinais de larvas de *C. licus* comparadas à atividade específica de quimotripsina pura comercial, usada como controle. Em todos os ensaios, uma unidade foi definida como sendo o incremento de 0,001 na absorbância a 590nm por minuto, a 36° C. Cada ensaio enzimático foi feito três vezes e as médias das atividades proteolíticas observadas são apresentadas nas figuras.

Atividade de leucina-aminopeptidase (LAP)

Diversos métodos contínuos de ensaios enzimáticos de atividade de LAP foram descritos, sendo os mais adotados: (i) detecção de absorbância a 405nm do produto de reação *p*-nitroanilina [ARIMA *et al.*, 2005; NISBET e BILLINGSLEY, 2002; CRISTOFOLETTI *et al.*, 2003] (ii) medições espectrofotométricas contínuas a 412nm da hidrólise de L-leucina tiobenzil éster na presença de 5,5-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzóico) [BEATTIE *et al.*, 1987] e (iii) hidrólise de substratos peptidil fluorogêncios [McCARTHY *et al.*, 2004].

Apesar desses ensaios serem devidamente funcionais, há várias desvantagens, tais como: demasiado tempo necessário para os ensaios; são métodos laboriosos; e, em alguns casos, geram significativo ruído de *background*. Ademais, não há muitos ensaios espectrofotométricos para testar atividade de LAP que permitam testar a enzima sob diferentes condições biológicas, de diferentes fontes biológicas e na presença de compostos naturais interferentes. Nossos estudos iniciais foram feitos a fim de estabelecer condições ótimas de determinação de 2-naftilamina derivada de L-leucil-2-naftilamida na presença de LAP. No nosso ensaio espectrofotométrico, 5µL de extrato intestinal de larva de *C. licus* foram adicionados a 0,2mL de tampão fosfato pH 7.0 100mM e então pré-incubados durante 15 minutos a 36° C. Depois da adição de 5µL de *Fast Black K* 24mM, a reação foi iniciada pela incorporação de 5µL de L-leucil-2-naftilamida 14mM e foi permitida continuar pelo tempo desejado.

Como mostrado na Figura 2, o desenvolvimento da coloração do complexo formado entre 2-naftilamina and *Fast Black K* ocorre em menos de 10 minutos na presença de 5µL (22,5µg de proteína) de extrato intestinal de larva de *C. licus*. A curva do progresso de absorvância indica que ocorreu uma rápida conversão do substrato L-leucil-2-naftilamida no início da reação enzimática e subsequente decréscimo da taxa de conversão do substrato levando a um platô no fim da curva (Figura 2). Os valores de absorvância a 590nm aumentaram linearmente na curva entre o tempo zero e 4 minutos da reação enzimática, porém a curva exibiu valores decrescentes (curvatura descendente) em tempos superiores a 4 minutos de reação (Figura 2). Baseando-se nesses resultados, foi estabelecido um protocolo no qual a coloração se desenvolve durante os primeiros 4 minutos de reação.

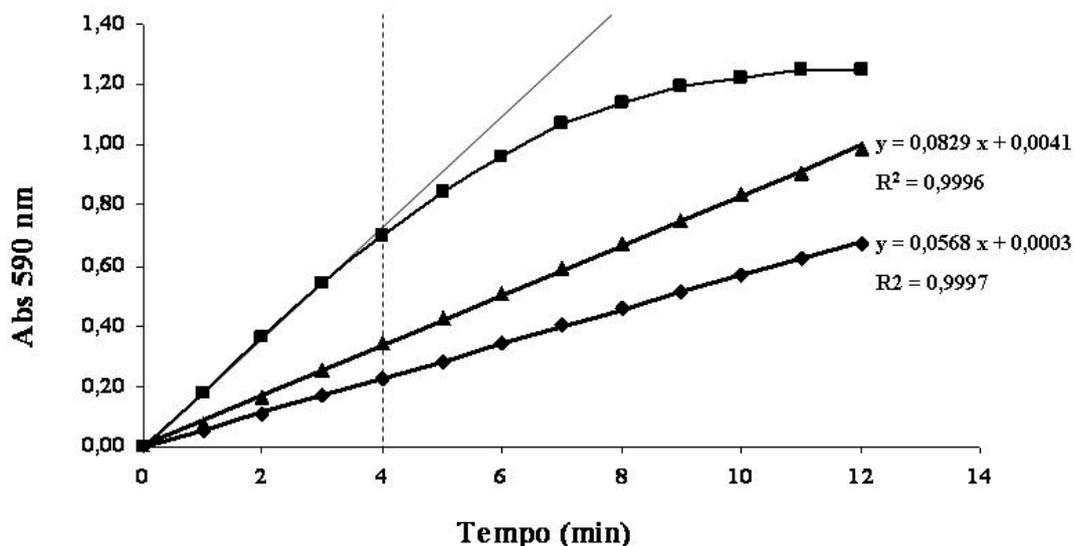


Figura 2: Atividade leucina-aminopeptidase (LAP) do trato intestinal de larvas de *C. licus* determinada utilizando-se o substrato sintético L-leucil-2-naftilamida. Ensaio padrão: 0,2mL de tampão fosfato pH 7.0 100mM contendo 5µL de extrato intestinal (equivalente a 0,025 do intestino) pré-incubado durante 15 minutos a 36° C e 5µL de *Fast Black K* 24mM. Após a subsequente adição de 5µL de L-leucil-2-naftilamida 14mM, mudanças nos valores de absorvância a 590nm foram registradas. (▲) corresponde a 5µL de extrato intestinal enzimático. (■) corresponde a 1µL de extrato intestinal enzimático.

Em um ensaio subsequente, o efeito da concentração da enzima intestinal na conversão enzimática *in vitro* de L-leucil-2-naftilamida foi examinada sob diferentes tempos da reação (Figura 3). Nesse ensaio, a mudança total na absorvância a 590nm foi registrada para quatro ensaios espectrofotométricos padrão separadamente. Em todos os tempos testados, a taxa inicial de hidrólise de L-leucil-2-naftilamida medida espectrofotometricamente pela liberação de 2-naftilamina foi uma função linear da quantidade de proteína do trato intestinal de larvas de *C. licus* (Figura 3).

É muito importante ressaltar que a atividade enzimática sobre L-leucil-2-naftilamida não foi afetada pela adição de *Fast Black K* no primeiro passo da reação enzimática.

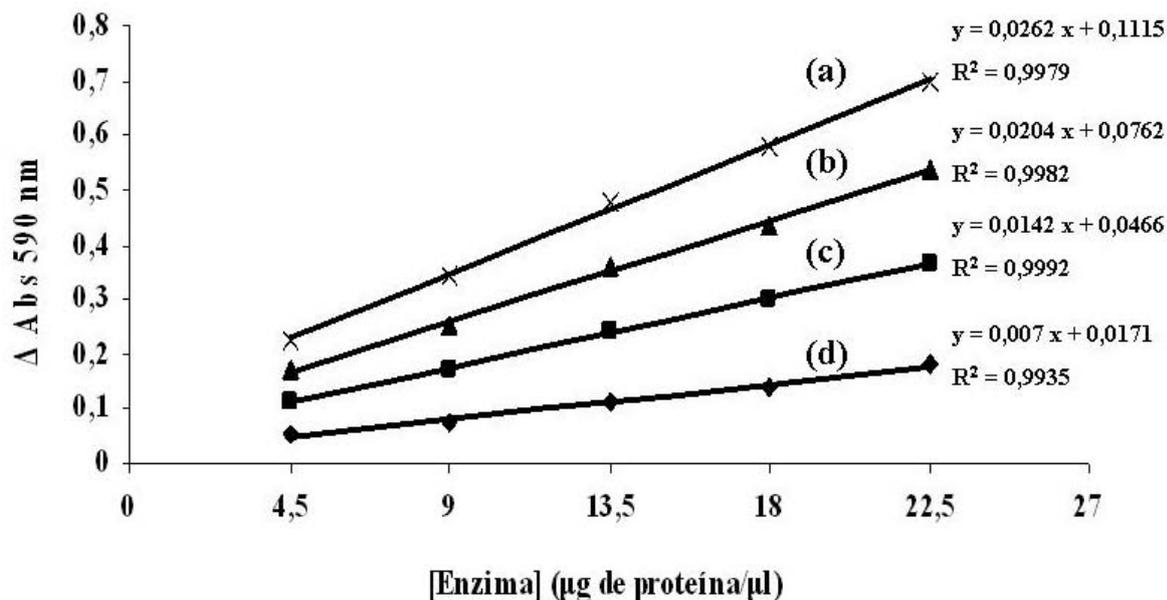


Figura 3: Curva do progresso da absorvância a 590nm (Δ Abs 590nm) em função da concentração da enzima leucina-aminopeptidase (LAP) do intestino de larvas de *C. licus*. Os valores das taxas foram determinados para quatro tempos de reação. A atividade de LAP intestinal de larvas de *C. licus* foi determinada utilizando-se o substrato sintético L-leucil-2-naftilamida. Após a adição de 5 μ L de L-leucil-2-naftilamida 14mM, a reação enzimática prosseguiu até 4 minutos e a partir de então a absorvância a 590nm foi registrada. As curvas da figura mostram o resultado de regressão linear dos dados obtidos. (a), (b), (c) e (d) correspondem respectivamente a 4, 3, 2 e 1 minuto (s) de reação enzimática.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

No presente trabalho, caracterizou-se parcialmente as atividades das proteases quimotripsina, tripsina e LAP intestinais de larvas de broca gigante da cana (*C. licus*), concluindo-se que:

- A atividade de tripsina intestinal representa 30% da atividade de quimiotripsina intestinal.
- Ambas as atividades de quimotripsina e tripsina intestinal foram 100% inibidas na presença de PMSF 2mM.
- Há considerável atividade de LAP em intestinos de *C. licus*, com um comportamento enzimático linear para os primeiros quatro minutos, nas condições testadas.
- A atividade de LAP é uma função linear da quantidade de proteínas intestinais de larvas de *C. licus*.

Portanto, as quimotripsinas e as LAPs intestinais de *C. licus* são alvos promissores para a busca de inibidores com potencial para controlar essa praga. Em ensaios futuros, a caracterização de atividade destas enzimas digestivas intestinais será também avaliada por zimogramas. A caracterização de atividade de cisteína-proteases intestinais será também realizada, a fim de avaliar quão promissoras seriam cisteína-proteases intestinais da larva como alvos de inibidores para o controle da praga.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.
- KANG, S.H.; FUCHS, M.S. An improvement in the Hummel chymotrypsin assay. **Analytical Biochemistry**, v.54, p.262-265, 1973.
- SCHWERT, G.W.; TAKENAKA, Y. A spectrophotometric determination of trypsin and chymotrypsin. **Biochimica Biophysica Acta.**, v.16, p.570-575, 1955.
- BEATTIE, R.E.; GUTHRIE, D.J.S.; ELMORE, D.T.; WILLIAMS, C.H.; WALKER, B. An improved spectrophotometric assay for leucine aminopeptidase. **Biochemistry Journal**, v.242, p.281-283, 1987.
- McCARTHY, E.; STACK, C.; DONNELLY, S.M.; DOYLE, S.; MANN, V. H.; BRINDLEY, P.J.; STEWART, M.; DAY, T.A.; MAULE, A.G.; DALTON, J.P. Leucine aminopeptidase of the human blood flukes, *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*. **International Journal of Parasitology**, v.34, p.703-714, 2004.

ARIMA, J.; UESUGI, Y.; IWABUCHI, M.; HATANAKA, T. Alteration of leucine aminopeptidase from *Streptomyces septatus* TH-2 to phenylalanine aminopeptidase by site-directed mutagenesis, **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p.7229–7235, 2005.

NISBET, A.J.; BILLINGSLEY, P.F. Characterization of aminopeptidase activity in scab mites (*Psoroptes spp.*). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.32, p.1123-1131, 2002.

CRISTOFOLETTI, P.T.; RIBEIRO, A.F.; DERAISON, C.; RAHBE, Y.; TERRA, W.R. Midgut adaptation and digestive enzyme distribution in a phloem feeding insect, the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. **Journal of Insect Physiology**, v.49, p.11-24, 2003.

CARACTERIZAÇÃO DAS INCLUSÕES PROTÉICAS DO *Bacillus thuringiensis* S811: UMA CEPA EFICAZ NO CONTROLE DAS PRAGAS DO ALGODOEIRO.

Quezado, M.^{1,2}; Vasconcelos, E.A.R.^{1,2}; Silva, T.S.¹; Batista, J.A.N.¹; Oliveira Neto, O.B.^{1,3}; Grossi-de-Sá, M.F.¹

¹EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia – PqEB Av. W5-Norte (final) Brasília – DF, Brasil, 70.770-900; ²UnB - Universidade de Brasília – Instituto de Biologia: Depto. de Biologia Celular. Campus Darcy Ribeiro, CEP: 70.910-900 – Brasília-DF. ³Centro Universitário Unieuro, - Brasília- DF
mquezado@cenargen.embrapa.br

RESUMO

Bacillus thuringiensis (Bt) é uma bactéria Gram-positiva que, durante a esporulação, produz inclusões cristalinas, denominadas δ -endotoxinas, de ampla atividade inseticida, específica para insetos de diferentes ordens e inofensivas para os mamíferos. Em virtude desta característica, esta endotoxina é muito utilizada no desenvolvimento de plantas transgênicas capazes 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. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo efetuar a caracterização de uma estirpe de Bt, do Banco de Germoplasma da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, com atividade tóxica para diversas pragas da cotonicultura, incluindo o bicudo-do-algodoeiro. Bioensaios preliminares determinaram a atividade da estirpe S811 contra as pragas do algodoeiro. As análises bioquímicas via SDS-PAGE e eletroforese bidimensional demonstraram a presença de proteínas com massa molecular de aproximadamente de 100kDa, 68kDa e 30kDa, bem como a presença de moléculas com *p/s* diferenciais na faixa de 100KDa. As análises de microscopia eletrônica mostraram a morfologia das estruturas cristalinas, detectando a presença de cristais quadrados, esféricos e bipiramidais. Com o intuito de determinar os genes *cry*, os quais estariam presentes nas estruturas detectadas, oligonucleotídeos específicos para genes de diferentes classes foram utilizados em reações de PCR, a fim identificar e isolar os genes em questão. Desta forma, três genes (*cry1Ab*, *cry1a12* e *cry8Ga*) foram identificados, corroborando os dados presentes na literatura. O gene *cry1a12* contém 2.160pb e tem 100% de identidade e similaridade com os outros genes *cry1a* já descritos na literatura. 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. Enquanto que o gene *cry1Ab*, mostrou ser 100% idêntico a outros genes já descritos na literatura. O presente trabalho apresenta a caracterização completa das inclusões protéicas de uma cepa eficaz no controle do bicudo algodoeiro, fornecendo importantes subsídios para os estudos que envolvem a utilização destes genes potenciais na geração de plantas transgênicas.

INTRODUÇÃO

B. thuringiensis (Bt) é uma bactéria de solo, anaeróbica facultativa, Gram-positiva, flagelada, esporulante, caracterizada por sua forma de bastão e pela presença de inclusões cristalinas protéicas – ICP ou Cry – (Benintende e Marquez, 1996). Em 1916, Aoki e Chigasaki demonstraram que a atividade inseticida ocorria em função de uma inclusão protéica (toxinas Cry), presente nas culturas de células vegetativas. Este microrganismo tem sido amplamente utilizado como agente de controle biológico de pragas agrícolas e vetores de doenças há mais de 50 anos, com um mercado estimado em 60 a 80 milhões de dólares por ano, correspondendo a cerca de 2% do total desse mercado. Inúmeras considerações são feitas em relação ao desenvolvimento de produtos à base de Bt, pois, ao contrário dos inseticidas químicos, não deixam resíduos no meio ambiente (Schnepf *et al.*, 1998).

Quanto à sua toxicidade, as toxinas Cry são caracterizadas por não serem nocivas a mamíferos, aves, anfíbios ou répteis, sendo, desta forma, específicas a grupos de insetos e alguns invertebrados. Seu modo de ação difere completamente do modo de ação dos pesticidas químicos, fazendo das toxinas Cry componentes-chave do manejo integrado de pragas (MIP), preservando os inimigos naturais e permitindo o manejo de resistência. Sendo assim, limitações presentes nas formulações convencionais de Bt (restrito espectro de ação, dificuldades de acesso a algumas pragas e limitada persistência no campo, devido à degradação por fatores ambientais) podem ser superadas por meio de processos biotecnológicos, como a tecnologia do DNA recombinante, a qual permite a introdução de genes exógenos em um determinado organismo, possibilitando a obtenção de plantas transgênicas.

O setor agrícola mundial se inseriu na era biotecnológica, aderindo ao uso de plantas transgênicas com resistência a pragas, herbicidas e vírus, entre outros. Os países que adotaram a tecnologia apresentaram incremento na produtividade e redução no custo de produção. E isso pode ser observado pela área global com plantas transgênicas cultiváveis, que cresce anualmente a uma velocidade intensa. Em 1996, foram

cultivados 1,7 milhões de hectares com plantas transgênicas, e em 2003 os índices mostram um aumento da área, que atinge 59 milhões somente com soja, algodão, milho e canola. Em 2004, a área cultivada chegou a 67,7 milhões de hectares, sendo que 22 milhões correspondem a plantas que expressam genes *cry*.

Inúmeros genes *cry* têm sido introduzidos em plantas como fumo, tomate, batata, algodão, milho e outras (Perlak *et al.*, 1990), inclusive com modificações genéticas e fusões de genes, resultando num espectro de ação mais amplo. Na China, estudos mostram que, ao final da produção, 60% dos custos finais são reduzidos com a utilização de algodão transgênico (Ferry *et al.*, 2006). Além destes benefícios, a produtividade se torna elevada em função do melhor controle de pragas.

Atualmente, os Estados Unidos contribuem com 39 milhões de hectares cultivados com plantas transgênicas, a Argentina com 13,5 milhões e a China com 3 milhões (Raney, 2006). Os Estados Unidos e a China desenvolvem tecnologias adequadas à realidade local, tornando-se grandes competidores mundiais. Assim, faz-se necessário o desenvolvimento desta tecnologia no Brasil, objetivando a geração de produtos competitivos mundialmente, para, num futuro próximo, o país figurar entre os maiores exportadores de fibra de qualidade.

Neste contexto, o algodão vem ganhando importância 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 as pragas mais severas, destacam-se *S. frugiperda*, por se alimentar de folhas, e *A. grandis*, um inseto fitófago de difícil controle, que se alimenta e se reproduz no interior de estruturas frutíferas do algodoeiro (botões florais e frutos verdes). Assim, o bicudo utiliza essas estruturas tanto para alimentação quanto para o desenvolvimento de suas fases imaturas (ovo, larva e pupa). Quando atinge o estágio adulto, o inseto abandona o abrigo vegetal e começa sua fase de vida livre.

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

Assim, a partir da identificação e caracterização de estirpes de *B. thuringiensis*, o isolamento de genes que codifiquem proteínas quanto ao potencial entomotóxico para posterior utilização em programas biotecnológicos destinados a obtenção de plantas transgênicas resistentes a insetos é uma medida atual e necessária.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi selecionada uma estirpe de *B. thuringiensis* pertencente ao Banco de Germoplasma Microbiano da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, com base na sua toxicidade contra os insetos *A. grandis* e *S. frugiperda*. A seleção foi feita por meio da avaliação da toxicidade em bioensaios seletivos, nos quais foram utilizados os extratos protéicos totais das bactérias Bt. Foram consideradas efetivas as estirpes que apresentaram uma porcentagem de mortalidade superior a 50%.

As misturas esporos-cristais para análise das proteínas foram preparadas de acordo com o protocolo descrito por Souza (SOUZA *et al.*, 1993). Foram feitas caracterizações genéticas, bioquímicas e morfológicas dos cristais purificados, levando-se em conta os genes presentes e o tipo de inclusão cristalina.

Estas preparações foram analisadas por meio de eletroforese em gel desnaturante de poli(acrilamida) a 10% (SDS-PAGE), conforme procedimento descrito por Laemmli (1970), e, posteriormente, por eletroforese bidimensional. Em seguida, o perfil eletroforético foi eletrotransferido para uma membrana de nitrocelulose, segundo o protocolo descrito por Towbin (TOWBIN *et al.*, 1979). Após a eletrotransferência, a membrana foi incubada com anticorpos Anti-Cry11 e Anti-Cry8 em PBS, numa diluição de 1:2000 e 1:5000, respectivamente. Foi utilizado um segundo anticorpo conjugado a fosfatase alcalina (goat anti-rabbit AP).

Para a extração de proteínas intracelulares, o método descrito por Schimid (SCHIMD *et al.*, 1997) foi modificado. Cem microgramas de cristais purificados foram ressuspensos no tampão de rehidratação (7M uréia, 2M thiourea, 2% CHAPS, 0,5% IPG Buffer 3-10, 65mM DTT). Para a focalização isoeletrica, Immobiline DryStrips de 18cm, pH 3-10 (G.E. Health Care) foram rehidratadas com 350µL de uma solução de uréia 7M, tiouréia 2M. As amostras de cristais foram aplicadas por meio de "cup load". O procedimento foi realizado em um sistema Multiphor II IEF (G.E. Health Care) alimentado por uma fonte EPS XL 3501 (G.E. Health Care) em modo gradiente. Para a segunda dimensão, foi utilizado o sistema

Ettan Dalt Six (G.E. Health Care) com géis a 12,5%. As condições elétricas foram as descritas pelo fabricante. Os *spots* protéicos foram visualizados por coloração com Coomassie brilliant blue. Cada experimento foi conduzido em triplicata.

A proteína de interesse foi excisada do gel e digerida com tripsina (Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade, Promega) seguindo uma modificação do método descrito por Rosenfeld (Rosenfeld *et al.*, 1992) e analisada por espectrometria de massa (Ultraflex II - Bruker Daltonics). A lista de massas obtida foi utilizada para o "Petide Mass Fingerprint" com o MASCOT Daemon (Matrix Science, London, UK) como ferramenta de busca. A busca por homologia foi realizada contra o banco de dados do Siwssprot.

As suspensões de cristais purificados da estirpe S811, obtidas conforme descrito, foram liofilizadas e depositadas sobre suportes metálicos. As amostras foram cobertas com ouro por 180 s, utilizando-se metalizador EMITECH modelo K550, e observadas em microscópio eletrônico de varredura Zeiss modelo DSM 962. A microscopia de luz foi realizada com as células ainda em estado vegetativo, em microscópio Leika MPS 60, com e sem contraste de fase.

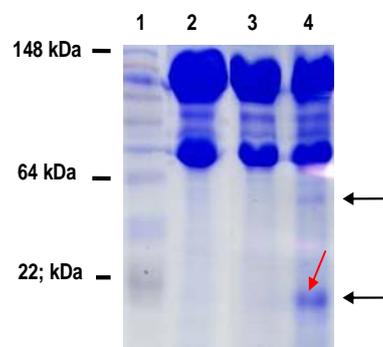
A extração de DNA (CTAB) total foi realizada para obtenção de DNA com grau de pureza suficiente para amplificação por PCR. A técnica foi utilizada para identificação dos genes *cry* presentes nos isolados. As amplificações foram realizadas utilizando oligonucleotídeos específicos para detecção de genes do subgrupo *cry1* (Cerón *et al.*, 1994 e 1995) e *cry8* (Bravo *et al.*, 1998). 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/>).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram observadas duas proteínas majoritárias de 130-140kDa e 70-80kDa (figura 5A). Devido à existência de aparentes degradações no extrato protéico, duas extrações distintas foram realizadas: na presença e na ausência de um inibidor de serino-proteinase (PMSF). As frações contendo os extratos obtidos na presença de PMSF podem ser observadas na figura 1, nas linhas 2 e 3, sendo que, na linha 3, o extrato não foi submetido a fervura antes da aplicação em gel. Este procedimento foi realizado com o intuito de analisar o efeito da temperatura na possível degradação das proteínas do extrato; mas, neste caso, não foram observadas alterações. Quando analisada a amostra na ausência de PMSF (figura 1, linha 4), observamos o aparecimento de duas outras proteínas de 50 e 20kDa, aproximadamente (seta vermelha). Esses resultados demonstram que existe, efetivamente, uma proteína de aproximadamente 70-80kDa, a qual não é gerada a partir da degradação da proteína de maior massa molecular.

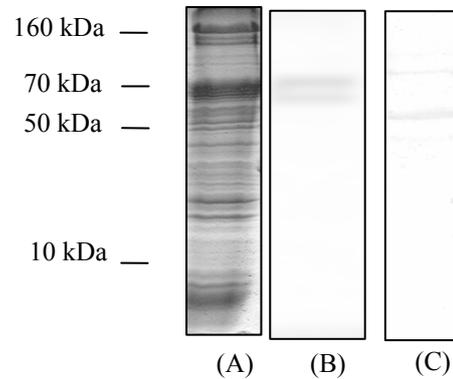
A proteína de 130-140kDa, observada na estirpe S811, é característica de estipes ativas contra lepidópteros, e é produzida, na maioria dos casos, pela expressão de genes do grupo *cry1* (Lereclus *et al.*, 1993). Por outro lado, as proteínas de 70-80kDa são características de estipes ativas contra lepidópteros, dípteros e, em alguns casos, contra coleópteros (Tailor *et al.*, 1992). O último exemplo ocorre no grupo de toxinas Cry1Ia, as quais possuem massa de 80kDa e estão relacionadas com atividade contra insetos da ordem Coleoptera (Tailor *et al.*, 1992) e Lepidoptera (Sasaki *et al.*, 1996).

Figura 1: Análise do perfil protéico da estirpe de *Bacillus thuringiensis* S811. Extrato total após a esporulação total (72 h). **Linha 1.** Marcador de massa molelular See Blue plus 2 (Invitrogen). **Linha 2 e 3.** Cristais solubilizados em solução tampão com PMSF. **Linha 4.** Cristais solubilizados sem PMSF. As setas indicam os produtos de degradação.



O Western blotting realizado com anticorpos antiCry8 e antiCry11 revelou que dentre as proteínas extraídas do sedimento da cultura de *Bt* S811, proteínas de massa molecular próximas a 70 KDa, tamanho esperado para a proteína codificada pelo gene *cry8*, interagem com os anticorpos antiCry8. Já os anticorpos antiCry11 interagiram com proteínas de aproximadamente 60 KDa.

Figura 2. (A) SDS-PAGE from *Bt* cells. **(B)** Western blotting with Cry 8 antibodies and **(C)** Cry 11a antibodies.



Os cristais purificados, quando resolvidos por eletroforese bidimensional, apresentaram um spot de 140kDa e ponto isoelétrico de 5.2, que foi identificado por PMF como a toxina Cry1ab. A presença das toxinas Cry8, Cry11 e Cry1ab dão um suporte traducional à descrição genômica feita por Martins e colaboradores (Martins *et al.*, 2007), que descreveram a presença desses genes nesta cepa.



Match to: *CRIAB_BACTA*: 209 Expect: 3.3e-16
Taxonomy: *Bacillus thuringiensis* serovar *aizawai*

	Start	End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	Miss	Sequence
1	MDNNPNINEC	IPYNCLSNPE	VEVLGGERIE	TGYTPIDISL	SLTQFLLSEF			
101	EGLSNLYQIY	AESFREWVAD	PTNPAALREEM	RIQFNDNNSA	LTTAIPLFAV			
151	QNYQVPLLSV	YVQAANLHLS	VLRDVSVEGQ	QWGFDAATIN	SRYNLRLRI			
201	GNYTHAVRW	YNTGLERVWG	PDSRDWIRYM	QFRRELTIV	LDIVSLFPNY			
251	DSRTYPIRIV	SQLTREIVYN	PVLENFDGFS	RGSAQIGEGS	IRSPHLMIDIL			
301	NSITLYTDAH	RGEYVWSGHQ	IMASPVGFSG	PEFTFPPLYGT	MGNAAPQORI			
351	VAQLGGGVYR	TLSSLYRFRP	FNIGINMQQL	SVLDGTEFAY	GTSSNLPFAV			
401	YRKSQTVDSL	DEIPPPQHWV	PPRQGFSHRL	SHVSMFSGF	SHSSVSIIRA			
451	DMESWIHRSA	EFNMLPSSQ	ITQIPLTKST	MLGOSTSVVK	GGPFTGGDIL			
501	RRTSPQQIST	LRWMTAPLS	QRYSVIRIYA	STTNLQFHTS	IDGRFINQNG			
551	FSATMSSGSH	LQSGSFRIVG	FTTFPMFSG	SSVFTLSAHV	FNSGNEVYID			
601	RIEFVPAKVT	FEAEYDLERA	QKAVNMLFST	SNQIGLKTIV	TDYHIDVSN			
651	LVECLSDFC	LDEKKELEK	VKHAKRLSDE	RNLLQDPNFR	GINRQLDRGW			
701	RGSTDTIQG	GDDVFKENYV	TLGTFDECY	PTYLYQKIDE	SKLKAYTRYQ			
751	LRGSLIEDSQD	LELYLRYNA	KHETVMVPGT	GSLWFLSAPS	PIGKCAHSH			
801	HFSLIDVGC	TDLNEDLGVW	VIFKIKTQDG	HARLGNLELF	EEKPLVGEAL			
851	ARVKRAEKKW	RDKREKLEWE	TNIVYKEAKE	SVDALFVNSQ	YDRLQADTNI			
901	AMHAADKRV	HSIREAYLPE	LSVIPGVNAA	IFEELEGRIF	TAFSLYDARN			
951	VINIGDFNMG	LSCUNVKGHV	DVEEQNHRS	VLVVFWEAE	VSQEVKVCPG			
1001	ROYILRVTAI	KEGYGECVT	IHEIEMNDE	LKFSMCEVEE	VFPNVTVCN			
1051	DYTAQGEIYE	GTYTSPNRGY	DGAYESNSV	PADYASAYEE	KAYTDGRDN			
1101	PCESNRGYGD	YTPLPAGVVT	KELEYFPETD	KVUIEIGETE	GTFIVDSVEL			
1151	LLHEE							

Figura 3. (A) Two-dimensional electrophoresis of purified crystal of *Bt* S811 strain. A spot with 140 KDa and an 5.2 pI was identified as Cry 1ab by Peptide Mass Fingerprint **(B)**.

Por microscopia de contraste de fase, observamos a formação do esporo (figura 4B). A análise por microscopia confocal (figura 4A) mostrou a presença majoritária de cristais bipiramidais em meio de cultura, após 72 horas de cultivo, e também a presença de alguns esporos, os quais aparecem de forma translúcida. Cristais de formato bipiramidal foram descritos por (Hofte e Whiteley, 1989) na estirpe-padrão

para lepidópteros BT *kurstaki* HD1. Os autores ainda descrevem nesta estirpe a presença de três tipos de genes codificadores de proteínas-cristal, específicos para lepidópteros: *cry1Aa* e *cry1Ac*, que codificam proteínas de 140kDa e *cry1Ab* que codifica uma proteína de 130kDa, as quais se agregam formando estruturas bipiramidais. Os cristais encontrados de formato esférico (figura 4D) podem estar correlacionados com a atividade inseticida contra coleópteros, uma vez que a o padrão Bt para coleópteros apresenta cristais com o mesmo tipo de formato (Martins *et al.*, 2005). Não obstante, as estirpes Bt866, que expressa a toxina coleóptero-específica Cry3Aa (Herrnstadt *et al.*, 1986), e SDS-502 que expressa a toxina Cry8Da (Asano *et al.*, 2003), também apresentam cristais no formato esférico, sugerindo a presença de genes desta natureza na estirpe S811.

O isolamento dos genes específicos por PCR (*Polimerase Chain Reaction*) com oligonucleotídeos iniciadores previamente descritos por Bravo (BRAVO *et al.* 1998) e Cerón (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 284pb), 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 à 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 (442pb) 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 442pb para clonagem do gene completo, utilizando a técnica de TAIL-PCR, que gerou um produto final com aproximadamente 2.600pb. Estes genes *cry8Ga* e *cry1Ia12* foram expressos em sistema heterólogo *E. coli* (Figura 5) 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 larvas, indicando alta toxicidade das toxinas Cry8Ga e Cry1Ia12 (Figura 4).

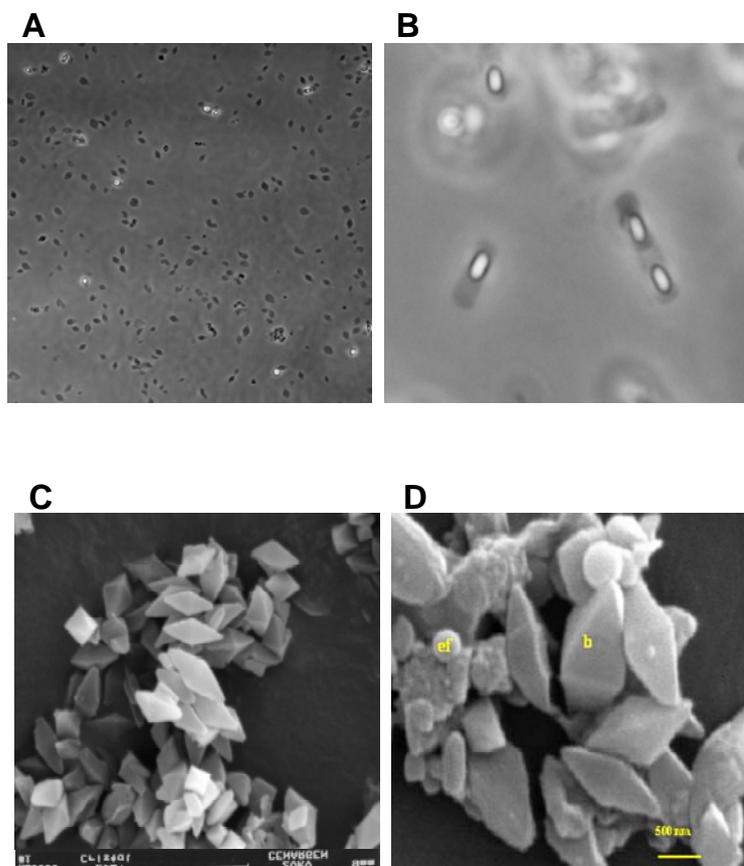


Figura 4. Microscopias confocal, contraste de fase e eletrônica de varredura

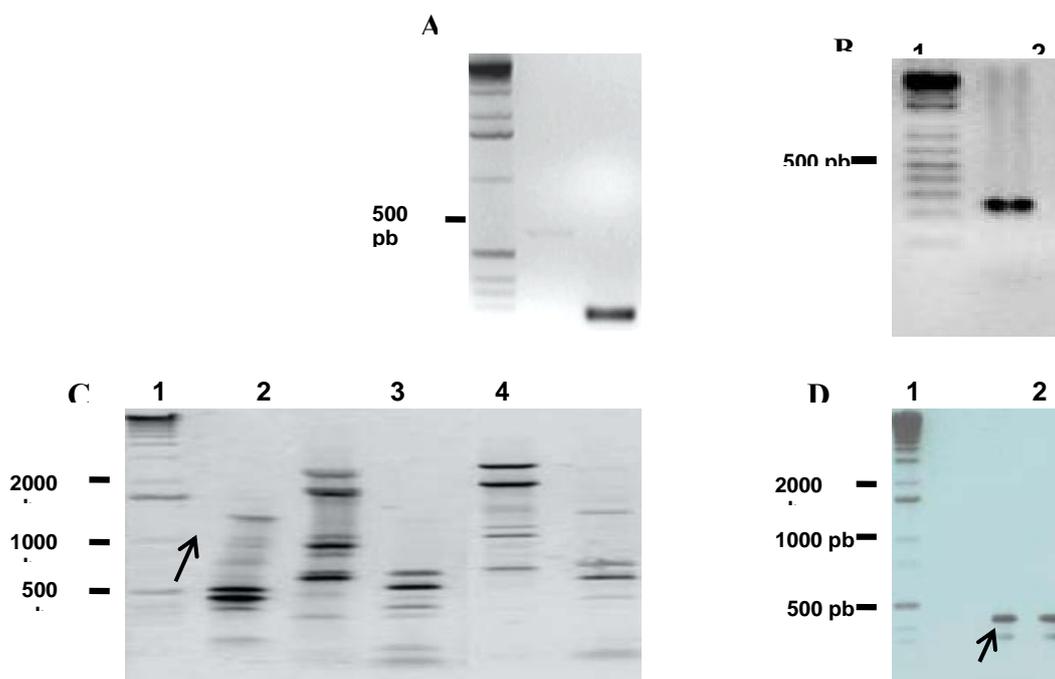


Figura 5. Amplificação dos genes *cry1Ab* (A) , *cry1Ia12* (B) e *cry8Ha1* (C e D)

PERSPECTIVAS

Concluir a caracterização dos cristais por Microscopia de Força Atômica, uma abordagem ainda inédita. Neste sentido, parâmetros como volume, elasticidade, dureza e forma nanométricas dos cristais poderão ser analisados, fornecendo importantes respostas ao estudo dos cristais em questão.

REFERÊNCIAS

- BENINTENDE, G. E A. M. MARQUEZ. Bactérias entomopatógenas. In: R. Lecuona. (Ed.). Em microorganismos patógenos empleados em el Control Microbiano de Insectos Plaga., v.Capítulo 4: Bacterias Entomopatógenas, 1996. **Bactérias entomopatógenas**, p.61-65
- DE SOUZA, M. T., M. M. LECADET E D. LERECLUS. Full expression of the cryIIIA toxin gene of *Bacillus thuringiensis* requires a distant upstream DNA sequence affecting transcription. **Journal Bacteriology**, v.175, n.10, May, p.2952-2960. 1993.
- FERRY, N., M. EDWARDS, J. GATEHOUSE, T. CAPELL, P. CHRISTOU E A. GATEHOUSE. Transgenic plants for insect pest control: A forward looking scientific perspective. **Transgenic Research**, v.15, n.1, FEB, p.13-19. 2006.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, n.5259, Aug 15, p.680-685. 1970.
- PERLAK, F. J., R. W. DEATON, T. A. ARMSTRONG, R. L. FUCHS, S. R. SIMS, J. T. GREENPLATE E D. A. FISCHHOFF. Insect resistant cotton plants **Biotechnology** (N Y), v.8, n.10, Oct, p.939-943. 1990.
- RANEY, T. Economic impact of transgenic crops in developing countries. **Current Opinion in Biotechnology**, Mar 4. 2006.
- SCHNEPF, E., N. CRICKMORE, J. VAN RIE, D. LERECLUS, J. BAUM, J. FEITELSON, D. R. ZEIGLER E D. H. DEAN. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.62, n.3, SEP, p.775-+. 1998.
- MARTINS, E.S., PRAÇA, L.B., DUMAS, V.F., SILVA-WERNECK, SONE, E.H., WAGA, I.C., BERRY, C., MONNERAT, R.G. Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates toxic to cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*). **Biological Control**, v.40, p.65-68, 2007.
- ROSENFELD, J., CAPDEVIELLE, J., GUILLEMOT, J.C., FERRARA, P. In-gel digestion of proteins for internal sequence-analysis after 1-dimensional or 2-dimensional gel-electrophoresis. **Analytical Biochemistry**. v.203 (1), p.173-179, 1992.

SCHMID, R., BERNHARDT, J., ANTELMANN, H., VOLKER, A., MACH, H., VOLKER, U., HECKER, M. Identification of vegetative proteins for a two-dimensional protein index of *Bacillus subtilis*. **Microbiology**, v.143, p.991-998, 1997.

TOWBIN, H., STAEHELIN, T., GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets - procedure and some applications. **Proceeding National Academy of Science USA**, v.76 (9), p.4350-4354, 1979.

INFLUÊNCIA DO GRUPAMENTO N-ACIL DAS HOMOSERINA-LACTONAS NA SUA LIGAÇÃO COM A HOMOSERINA-LACTONA HIDROLASE DE *Bacillus thuringiensis*

Lucena, W¹; Lima, L. M.¹; Straatsma, T. P.²; Lins, R. D.²

¹Laboratório de Biologia Molecular de Insetos, EMBRAPA Algodão, Campina Grande, PB 58107-720, Brazil; ²Computational Biology and Bioinformatics, Pacific Northwest National Laboratory, Richland, WA 99352, USA.

RESUMO

“Quorum sense” é um mecanismo utilizado por bactérias, mediado por transdução de sinal, para o desenvolvimento de um comportamento coletivo. A quebra de sistemas de QS mediados pelas N-acil Homoserina-Lactonas (AHLs) tem sido alvo de pesquisas na busca por novas ferramentas de controle das bacterioses e a compreensão das bases moleculares deste fenômeno – ou seja, dos mecanismos catalíticos – é de fundamental importância. Neste trabalho, simulações de dinâmica molecular foram utilizadas para caracterizar a ligação de duas homoserina-lactonas ao sítio catalítico da N-acil Homoserina Lactona Hidrolase de *Bacillus thuringiensis* (BTK-AiiA). A ausência da cadeia N-acil no substrato acarreta um aumento na flexibilidade do sítio de ligação, ou seja, as homoserinas lactonas se ligam de forma mais estável por meio das pontes de hidrogênio, entre o D108 e o grupamento N-acil, e interações hidrofóbicas entre o grupo metil e a cadeia lateral dos resíduos I73, F64 e F107. O posicionamento do anel da lactona do N-formil Homoserina Lactona (NFH) próximo ao Y194 sugere que este resíduo seja o responsável pelo evento inicial da catálise. Os resultados deste trabalho indicam que a presença do grupo N-acil é essencial para uma catálise eficiente da homoserina. Também foi caracterizado o modo de ligação do substrato e identificados os resíduos responsáveis pela ligação ao substrato. Estes resultados são de grande valia para um entendimento das bases moleculares da regulação “quorum-quenching” em *B. thuringiensis*, e, conseqüentemente, na formação de biofilmes.

INTRODUÇÃO

“Quorum Sensing” (QS) pode ser definido como a habilidade que algumas bactérias têm de coordenar um comportamento coletivo por meio de um mecanismo regulador via expressão simultânea de grupos de genes e transdução de sinal. Este fenômeno foi descrito pela primeira vez por em *Vibrio fischeri* (NAELSON, 1970). Bactérias usam o QS para regular uma série de fenótipos, como formação de biofilmes, bioluminescência, produção de antibióticos e expressão de fatores de virulência (CAMILLI, 2006). Considerando que alterações no QS podem influenciar as infecções agudas, nos mais diversos organismos hospedeiros, alterações no padrão de QS podem ser usadas para controlar a densidade populacional bacteriana e assim debelar as bacterioses. A síntese de auto-indutores (AI) é a etapa inicial da cascata de sinal e em bactérias Gram-negativas, as N-acil homoserina lactonas (AHLs) são os componentes difusíveis responsáveis por esta etapa (RASMUSSEN, 2006) e são sintetizados por uma família homóloga a LuxI. (PARSEK *et al.*, 1999 in RASMUSSEN, 2006). Um segundo grupo de enzimas é responsável pela clivagem do anel de homoserina das AHLs e, portanto, denominadas de enzimas “Quorum-quenching” (QQ). A inativação e/ou ausência de mensageiros QS pode inibir a formação de biofilmes e, conseqüentemente, evitar a infecção bacteriana.

Recentemente, uma N-acil homoserina-lactona hidrolase (AiiA) com 250 resíduos foi isolada de *Bacillus thuringiensis* – BTK (DONG *et al.*, 2000). Esta BTK-AiiA tem um domínio de ligação ao zinco altamente conservado (104HXHXDH109 ≈ H169) (DONG *et al.*, 2002; LEE *et al.*, 2002; KIM *et al.*, 2005). BTK-AiiA é conhecida por quebrar N-acil(S)-homoserina-lactonas com cadeias acil entre 4 e 10 carbonos. E, embora esta enzima seja ativa para diferentes N-acil substratos, não consegue clivar a homoserina lactona (HSL) sem as cadeias N-acil, sugerindo que a amida da cadeia N-acil seja essencial para a ligação ao substrato (KIM *et al.*, 2005).

Dados bioquímicos sobre a atividade catalítica, bem como duas estruturas cristalográficas, foram publicados com o intuito de elucidar o mecanismo catalítico e a importância dos resíduos presentes no sítio ativo, assim como o início da reação, desde a acomodação do substrato no cerne da enzima até a clivagem do anel de homoserina. (THOMAS *et al.*, 2005; LIU *et al.*, 2005; KIM *et al.*, 2005). Entretanto, ainda não foi possível esclarecer as interações entre o substrato e o sítio enzimático. Com o objetivo de verificar a influência do grupamento N-acil na ligação do anel de lactona à lactonase, simulações de dinâmica molecular foram realizadas com a BTK-AiiA livre em solução e formando complexos com HSL e com N-formil Homoserina-Lactona (NFH).

MATERIAL E MÉTODOS

Um arquivo PDB contendo a estrutura cristalográfica da BTK-AiiA, solvatada com a resolução de 1.6 Å foi obtido a partir do banco de dados (LIU *et al.*, 2005) e usado como ponto de partida para as simulações. Três sistemas foram estudados: i) AiiA: a enzima com uma hidroxila e dois íons de zinco no sítio ativo; ii) AiiA-HSL: AiiA com uma HSL e iii) AiiA-NFH: AiiA com uma N-formil- homoserina lactona (NFH). As posições iniciais para os substratos foram baseadas na estrutura descrita por (KIM *et al.*, 2005). Os três sistemas foram calibrados sob condições periódicas em uma caixa cúbica com 7,8nm de aresta e solvatados enchendo as caixas com moléculas de água (SPC/E) (Berendsen *et al.*, 1987) distantes entre si por 0,28nm e preservando as 180 moléculas cristalográficas de água. As histidinas 104, 109, 169 e 235 foram protonadas no nitrogênio δ. Sete moléculas de água com alto potencial eletrostático foram substituídas por 6 Ca²⁺ e 1 Na⁺. Este procedimento resultou nos seguintes sistemas: i) AiiA: 1 molécula de proteína (3,948 átomos), 2 íons Zn²⁺, 1 hidroxila (OH⁻), 7 íons e 14,512 moléculas de água (47,495 átomos); ii) AiiA-HSL: 1 molécula de proteína (3,948 átomos), 1 homoserina lactona (HSL), 2 Zn²⁺, 1 OH⁻, 7 íons e 14,509 moléculas de água (47,500 átomos) e iii) AiiA-NFH: 1 molécula de proteína (3,948 átomos), 1 N-formil homoserina lactona (NFH), 2 Zn²⁺, 1 OH⁻, 7 íons e 14,460 moléculas de água (47,358 átomos).

Simulações de Dinâmica Molecular

Todas as simulações foram realizadas com o campo de força AMBER96 (CORNELL *et al.*, 1995) e utilizando uma versão paralela do programa NWChem-4.7 (APRA *et al.*, 2005). Os sistemas foram equilibrados passo a passo. Inicialmente, o solvente e os substratos foram relaxados usando 5000 passos de minimização, mantendo a proteína e os íons fixos, seguidos de 500 passos de minimização com todos os átomos livres. Posteriormente, foram utilizados 10 pico segundos (ps) de dinâmica molecular (MD) a 50°, 100°, 150°, 200°, 250° e 300° K. Finalmente, as MD foram seguidas sob condições isotérmicas e isobáricas por 4.0 nano segundos (ns) (BERENDSEN *et al.*, 1984) com tempos de relaxamento de 0.1ps.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Flexibilidade da Proteína

Os desvios root-mean-squared (RMSD) de todos os átomos da proteína foram calculados ao longo das trajetórias de 2 e 4ns, tendo como referência a estrutura cristalográfica do PDB 2A7M. O RMSD variou entre 0.025 to 0.225nm. Todos os sistemas estudados apresentaram RMSDs maiores do que a BTK-AiiA sem lactonas, sugerindo que o anel de homoserina lactona aumenta a mobilidade da enzima. A N-formil homoserina lactona (módulo 1) promoveu um RMSD levemente maior quando foram comparadas as trajetórias de 2 e 4 ns. As flutuações root-mean-square (RMSF) dos NFH e HSL (e ambas as posições) apresentaram considerável desvio do B-factor obtido pela cristalografia. Existem 6 loops flexíveis formados pelos resíduos 22-28 (loop 1), 53-78 (loop 2), 125-138 (α 3 e loop 3), 175-186 (loop 4) 190-209 (loop 5) e 220-233 (loop 6). Os loops 1 e 2 mostraram grande aumento do RMSF, 0.7 e 0.8, respectivamente. O B-factor calculado a partir das trajetórias de 4ns foram de 46 Å² e 23 Å², respectivamente para o HSL e NFH, sugerindo que o NFH é mais estável dentro do sítio ativo da enzima.

Modo de ligação do HSL e NFH.

WANG *et al.*, 2004, através de ensaios bioquímicos, apresentaram dados sobre a especificidade e cinética da BTK-AiiA com diferentes substratos. A lactonase apresentou baixa atividade para o HSL. Outros autores hipotetizaram que HSL não é um substrato, mas na verdade, um inibidor (KIM *et al.*, 2005; LIU *et al.*, 2005) e que cadeias N-acil são necessárias para ocorrer a catálise, embora a enzima clive o anel de lactona no carbono da carbonila. As distâncias entre os íons de zinco e os oxigênios presentes na lactona. Todas as distâncias entre o oxigênio da carbonila e o zinco correspondente, nas duas posições da HSL testadas, foram constantes em todas as simulações. As distâncias entre o oxigênio do "leaving group" e o zinco correspondente da HSL em ambos os modelos variaram entre 0.25nm e 0.6nm. Estes resultados sugerem que o anel do HSL não interage com o sítio catalítico.

O NFH, no módulo 2, rotaciona o "leaving group" para longe do sítio catalítico, apresentando uma distância média de 0.45nm. Apenas NFH, módulo 1 permanece próximo ao zinco com uma distância média de 0.325nm e, portanto, ligado à enzima mais estavelmente. Estes resultados confirmam que a cadeia N-acil é necessária para estabilizar o substrato no sítio enzimático e provavelmente contribui para a ação nucleofílica através da interação com os zínco.

Resíduos importantes na ligação.

Os resíduos F107, I73, M138, F64, M53, D108 e Y194 foram considerados importantes para a ligação e reação catalítica. Por isso, as interações entre estes resíduos e o sítio ativo foram analisadas ao longo das trajetórias. Uma análise das variações das distâncias entre o C3 (carbono da carbonila do anel da lactona),

N4 (nitrogênio da HSL e da NFH), O5 (oxigênio da carbonila da cadeia N-acil) e C6 (grupamento metil) da cadeia N-formil mostraram aspectos importantes da ligação da AHL. KIM *et al.* (2005) e LIU *et al.* (2005) postularam que a catálise é mediada pelos resíduos D108 e Y194, que o HSL pode apresentar duas posições de encaixe no cerne da enzima e que o carbono da carbonila do anel da lactona pode apresentar duas orientações em relação aos íons de zinco (faces *si* ou *re*). Para elucidar estas questões, nós medimos as distâncias entre o C3 (HSL e NFH, módulos 1) e o OD1 (oxigênio) do D108 e o OH do Y194. A variação da distância C3-HSL/OH-Y194 sugere que este resíduo não interage com o anel da lactona. Apesar da C3-HSL/OD1-D108 variar cerca de 0.3nm ao longo da simulação, esta interação não é forte o suficiente para estabilizar o HSL no sítio ativo e não contribui para as discrepantes configurações encontradas para a HSL dentro do sítio ativo. As distâncias médias de OD1-D108 e OH-Y194 para C3-NFH obtidas nas trajetórias foram de 0.35nm e ca. 0.3 nm, respectivamente. Contudo, as variações das distâncias C3-NFH/OD1-D108 foram menores do que as medidas a partir do Y194, sugerindo que o N-formil interage com o D108 de forma mais estável, e, portanto, apresentando uma face *re*, com o “leaving group” o carbono da carbonila voltados para o resíduo D 108. As distâncias N4/D 108 apresentaram-se diferentes quando HSL e NFH foram comparadas, ao longo das trajetórias de 4ns. No sistema AiiA-HSL, estas distâncias variaram entre 0.27nm e 0.67nm, contudo, após 2.5 ns de simulação foi observado um comportamento altamente inconstante e variável, sugerindo que o D 108 não interage com o N4. No caso do sistema AiiA-NFH, o N-formil permanece atracado ao sítio catalítico com distância média de 0.4nm. O resíduo F107 também não parece interagir com o NFH, apesar das distâncias médias serem menores do que 05nm.

Finalmente, para identificar as configurações mais comuns dos substratos ligados, nós calculamos os “clusters” para HSL e NFH. HSL apresentou 7 “clusters”, sendo dois deles correspondentes a 52.3% e 44.8% do total e NFH apresentou 12 “clusters”, com os dois mais freqüentes ocupando 69,3% e 23.6%, respectivamente. Estes resultados revelam que NFH, como substrato mais estável e na posição preferencial é potencialmente mais susceptível à clivagem pela BTK-AiiA lactonase.

CONCLUSÃO

Os fenótipos regulados pelo QS e mais especificamente pelas AHLs são considerados de grande importância médica, agrônômica, social e econômica (DONG *et al.*, 2000). A quebra de sistemas de QS mediados pelas AHLs tem sido alvo de pesquisas na busca por novas ferramentas de controle das bacterioses (KIM *et al.*, 2005). Compreender as bases moleculares deste fenômeno – ou seja, dos mecanismos catalíticos – é de fundamental importância. Neste trabalho, simulações de dinâmica molecular foram utilizadas para caracterizar a ligação das homoserina-lactonas ao sítio catalítico da BTK-AiiA. A ausência da cadeia N-acil nestas moléculas acarreta um aumento na flexibilidade do sítio de ligação, isto é, o substrato se liga de forma mais estável por meio de pontes de hidrogênio entre o D108 e o grupamento N-acil e interações hidrofóbicas entre o grupo metil e a cadeia lateral dos resíduos I73, F64 e F107. O posicionamento do anel da lactona do NFH próximo ao Y194 sugere que este resíduo seja o responsável pelo evento inicial da catálise. Em resumo, nós mostramos que a presença do grupo N-acil é essencial para uma catálise eficiente da homoserina, caracterizamos o modo de ligação do substrato e identificamos os resíduos responsáveis pela ligação ao substrato.

Estes resultados são de grande valia para um entendimento das bases moleculares da regulação “quorum-quencing” em *B. thuringiensis*, e, conseqüentemente, na formação de biofilmes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APRA E.; WINDUS T.L.; STRAATSMA, T.P.; BYLASKA, E.J.; DE JONG W, KOWALSKI, K.; HIRATA, S.; VALIEV, M.; HACKLER, M.T.; ZHAO, Y.; HARRISON, R.J.; DUPUIS, M.; SMITH, D.M.A.; NIEPLOCHA. J.; TIPPARAJU, V.; KRISHNAN, M.; AUER, A.A.; BROWN, E.; CISNEROS, G.; FANN, G.I.; FRUCHTL, H.; GARZA, J.; HIRAO, K.; KENDALL, R.; NICHOLS, J.A.; TSEMEKHMANN, K.; WOLINSKI K, A. J.; BERNHOLDT, D.; BOROWSKI, P.; CLARK, T.; CLERC, D.; DACHSEL, H.; DEEGAN, M.; DYALL, K.; ELWOOD, D.; GLENDENING, E.; GUTOWSKI M, H. A.; JAFFE, J.; JOHNSON, B.; JU, J.; KOBAYASHI, R.; KUTTEH, R.; LIN, Z.; LITTLEFIELD, R.; LONG, X.; MENG, B.; NAKAJIMA, T.; NIU, S.; POLLACK, L.; ROSING, M.; SANDRONE, G.; STAVE, M.; TAYLOR, H.; THOMAS, G.; VAN LENTHE, J.; WONG, A.; ZHANG, Z.; “NWChem, A Computational Chemistry Package for Parallel Computers, Version 4.7”. Pacific Northwest National Laboratory, Richland, Washington 99352-0999, USA. 2005.
- BERENDSEN, H.J.C.; POSTMA, J.P.M.; VAN GUNSTEREN, W.F.; DINOLA, A.; HAAK, J.R. Molecular dynamics coupling to an external bath. *Journal Chemistry Physical*, v.81, p. 3684-3690, 1984.
- CAMILLI, A.; BASSLER, B. Bacterial small-molecule signaling pathways. *Science*, v. 311, n.5764, p.1113-1116, 2006.

CORNELL, W.D.; CIEPLAK, P.; BAYLY, C.I.; GOULD, I.R.; MERZ, K.M.; FERGUSON, D.M.; SPELLMEYER, D.C.; FOX, T.; CALDWELL, J.W.; KOLLMAN, P.A. A 2nd generation force-field for the simulation of proteins, nucleic-acids and organic-molecules. **Journal American Chemistry Society**, v.117, p.5179-5197, 1995.

DONG, Y.H.; GUSTI, A.R.; ZHANG, Q.; XU, J.L.; ZHANG, L.H. Identification of quorum-quenching N-acyl homoserine lactonases from *Bacillus* species. **Applied Environmental Microbiology**, v 68, n.4, p.1754-1759, 2002.

DONG, Y.-H.; XU, J.-L.; LI, X.-C.; ZHANG, L.-H. AiiA, a novel enzyme inactivates acyl homoserine-lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. **Proceeding National Academy of Science USA**, v.97, p.3526-3531, 2000.

KIM, M.H.; CHOI, W.C.; KANG, H.O.; LEE, J.S.; KANG, B.S.; KIM, K.J.; DEREWENDA, Z.S.; OH, T.K.; LEE, C.H.; LEE, J.K. The molecular structure and catalytic mechanism of a quorum-quenching N-acyl-L-homoserine lactone hydrolase. **Proceeding National Academy of Science**, 102(49):17606-11, 2005

LEE, S.J.; PARK, S-Y.; LEE, J-J.; YUM, D. Y., KOO, B.-T.; LEE, J.-K. Genes Encoding the N-Acyl Homoserine Lactone-Degrading Enzyme are Widespread in Many Subspecies of *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.8, p. 3919-3924, 2002.

LIU, D.; LEPORE, B. W.; PETSKO, G. A.; THOMAS, P. W.; STONE, E. M.; FAST, W.; RINGE, D. Three-dimensional structure of the quorum-quenching N-acyl homoserine lactone hydrolase from *Bacillus thuringiensis*. **Proceeding National Academy of Science**, v.102, n.33, p.11882-11887, 2005.

NEALSON, K.H.; PLATT, T.; HASTINGS, J.W. Cellular control of the synthesis and activity of the Bacterial luminescent system. **Journal of Bacteriology**, v.104, n. 1, p.:313-22, 1970.

PARSEK, M.R.; VAL, D.L.; HANZELKA, B.L.; CRONAN, J.E.; GREENBERG, E.P. Acyl homoserine-lactone quorum-sensing signal generation. **Proceeding National Academy of Science**, v.96, p. 4360–4365, 1999.

RASMUSSEN TB, GIVSKOV M. Quorum sensing inhibitors: a bargain of effects. **Microbiology**, v.152, p.895-904, 2006.

THOMAS, P.W.; STONE, E.M.; COSTELLO, A.L.; TIERNEY, D.L.; FAST, W. The quorum-quenching lactonase from *Bacillus thuringiensis* is a metalloprotein. **Biochemistry**, v..44, n.20, p.:7559-7569, 2005.

WANG, L-H.; WENG, L-X.; DONG, Y-H.; ZHANG, L.H. Specificity and Enzyme Kinetics of The Quorum-quenching N-Acyl Homoserine Lactone Lactonase (AHL-lactonase). **Journal Biological Chemistry**, v. 279, p. 13645–13651, 2004.

CARACTERIZAÇÃO PROTEÔMICA DA CEPA S811 DE *Bacillus thuringiensis* E AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE SUAS PROTEÍNAS PARA *Anthonomus grandis*

Vasconcelos, E.A.R.^{1,2}; Silva, T.S.³; Magalhães, J.C.C.¹; Rocha, T.L.¹; Grossi-de-Sá, M.F.^{1,2}

¹EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia; ²UnB - Universidade de Brasília; ³UCB - Universidade Católica de Brasília.

ericoarv@cenargen.embrapa.br

RESUMO

Bacillus thuringiensis (*Bt*) é uma bactéria esporulante que produz proteínas entomopatogênicas, incluindo as toxinas Cry. Neste estudo, foi realizada uma caracterização da deposição de proteínas durante o ciclo celular da linhagem S811 de *Bt*, objetivando identificar novas proteínas entomopatogênicas. O ciclo celular da bactéria foi dividido em quatro diferentes estágios – 8, 16, 24 e 32 horas após a inoculação (HAI) –, de acordo com aspectos morfológicos observados por meio de microscopia de contraste de fase. Proteínas contidas no sobrenadante e no sedimento da cultura de cada um dos estágios avaliados foram utilizadas em bioensaios contra larvas de *Anthonomus grandis*, os quais apresentaram maiores taxas de mortalidade às 32 HAI para a fração do sobrenadante e às 8 HAI para a fração do sedimento. Por meio de análises via Western blotting, utilizando-se anticorpos Anti-Cry1Ia e Anti-Cry8, foi possível relacionar a toxicidade observada na fração do sedimento à presença da toxina Cry8. Contudo, a toxicidade observada na fração do sobrenadante não pôde ser relacionada à presença de Cry 8, nem de Cry1Ia, indicando a existência de outra proteína envolvida na toxicidade. As proteínas da fração do sobrenadante às 32 HAI foram subfracionadas por cromatografia de exclusão molecular, o que permitiu a identificação de uma toxina homóloga à Cry1ab, de aproximadamente 160kDa, via “Peptide Mass Fingerprint”. Adicionalmente, foram realizadas análises por 2DE/MS/MS com a fração do sobrenadante, a fim de identificar proteínas específicas das 32 HAI que pudessem estar relacionadas à toxicidade desse estágio. Dessa forma, foram identificadas 5 proteínas, entre as quais uma proteína de ligação à quitina que possivelmente é a responsável pela atividade entomotóxica da fração do sobrenadante no último estágio analisado.

INTRODUÇÃO

O algodão (*Gossypium hirsutum*) é uma importante cultivar para o agronegócio brasileiro, ocupando atualmente uma área de 1,034 milhões de hectares, com uma produção estimada em 734,7 mil toneladas em caroço, e 305 mil toneladas em pluma, conforme o quarto levantamento de grãos da Companhia Nacional de Abastecimento (2006/2007). Em 2005, esta cultura gerou um saldo líquido de 427 milhões de dólares para o Brasil, segundo estatísticas do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. No Brasil, a cultura do algodão sofre significativa perda devido à ação do bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis*, Coleoptera), inseto-praga que ataca e danifica o botão floral. Tendo isso em vista, a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia vem aplicando esforços para a produção de variedades de algodão geneticamente modificadas (GM) resistentes ao bicudo do algodoeiro.

Bactérias entomopatogênicas esporulantes utilizam uma variedade de proteínas que as auxiliam a invadir, infectar e matar seus hospedeiros. Muitas destas proteínas são produzidas quando o microorganismo se encontra em condições adversas e, coincidindo com a esporulação, formam inclusões cristalinas paraesporais que contêm uma ou mais proteínas entomotóxicas. (MAAGD, 2003; FEDERICI, 2005). A mais estudada destas bactérias é o *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), cujas variedades já identificadas produzem uma gama de proteínas tóxicas, dentre elas as toxinas Cry, as quais conferem a esta bactéria infectividade específica para diversas ordens de insetos (*Lepidoptera*, *Diptera*, *Coleoptera*, *Hymenoptera*, dentre outras). Plantas de algodão transgênico que expressam toxinas Cry já estão disponíveis no mercado, porém nenhuma das variedades comercializadas atualmente é específica para o bicudo-do-algodoeiro (JAMES, 2006).

A prospecção de genes para o uso em programas de melhoramento genético deve ser uma prioridade em países com potencial biotecnológico como o Brasil – terceiro entre os “*Biotech Mega-Countries*” (JAMES, 2006) – os quais têm condições de desenvolver produtos para sanar suas próprias necessidades. No caso do algodoeiro, a maior parte dos produtos transgênicos atualmente no mercado, como os Bollgard I e II, e o WideStrike, apresentam resistência a insetos da ordem *Lepidoptera*, como a *Helicoverpa spp.*, uma praga comum nos Estados Unidos. Entretanto, estes produtos não se adequam totalmente à realidade dos produtores do Brasil, onde a principal praga é bicudo-do-algodoeiro.

Um grande número de cepas de *Bt* está catalogado no Banco de Germoplasma de *Bacillus spp.* (BGB) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e da Embrapa Milho e Sorgo. A cepa S811 apresenta atividade inseticida contra larvas do bicudo-do-algodoeiro, e alguns genes que codificam para as toxinas Cry dessa cepa já foram descritos (MARTINS *et al.*, 2007, GROSSI-DE-SÁ *et al.*, 2007). Este estudo foi

desenvolvido com o intuito de avaliar o proteoma da cepa S811 de *Bt* durante seu ciclo celular, em busca das proteínas responsáveis pela sua atividade contra o bicudo.

MATERIAL E MÉTODOS

Condições de cultivo bacteriano

Para o estabelecimento da cultura de *Bacillus thuringiensis* (cepa S811), foi utilizada uma colônia para iniciar um pré-inóculo de 20mL de meio Caldo Nutritivo. O pré-inóculo foi mantido durante doze horas a 28 ° C, sob agitação a 200rpm, até apresentar uma densidade ótica (O.D. 600nm) de 2.0 – 2.5. Foram utilizados 10mL do pré-inóculo para inocular 200mL de meio Caldo Nutritivo. A cultura foi mantida sob agitação a 200rpm, em erlenmeyers de 2L, a 28 ° C. O Crescimento foi interrompido às 8, 16, 24 e 32 horas após a inoculação.

Microscopia de contraste de fase

Após a inoculação, foram retiradas amostras da cultura às 8, 16, 24 e 32 horas, a fim de se caracterizar os aspectos celulares por microscopia de contraste de fase (x 1,000).

Extração de proteínas

Para a extração de proteínas intracelulares o método descrito por Schimid (SCHIMD *et al.*, 1997) foi modificado. As células foram precipitadas por centrifugação a 4.000rpm durante 5 minutos, lavadas duas vezes com tampão TE (0,1M tris/HCl, 1mM EDTA, pH 7.5), e o sedimento foi ressuscitado em 40mL de tampão de sonicação (10mM Tris/HCl, pH 7.5, 5mM MgCl₂, 2mM PMSF). As células foram rompidas por sonicação (sonda de 5mm, 30W, 10minutos) sobre o gelo e os detritos celulares foram removidos por centrifugação, sendo o sobrenadante denominado extrato bruto do sedimento. Para a análise das proteínas do sobrenadante da cultura, o meio sem as células foi dializado contra água, resultando no extrato bruto do sobrenadante. Para a realização dos bioensaios, os extratos brutos do sobrenadante foram liofilizados. Para os experimentos eletroforéticos, os extratos brutos foram precipitados com TCA 10% durante 2 horas, a -20° C. O precipitado protéico foi lavado com acetona e secado em SpeedVac. O conteúdo protéico das frações do sedimento e do sobrenadante foi determinado pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

Bioensaio contra Anthonomus grandis

Para os bioensaios contra larvas neonatas de *A. grandis*, 500µg de proteínas de cada estágio foram solubilizadas em 5mL de uma dieta artificial, e depositadas em macroplacas de seis poços. Dez larvas neonatas foram postas em cada poço e as placas foram mantidas a 27° C (+/- 1 °C) e 60% de U.R. O número de larvas mortas foi determinado ao oitavo dia. Cada ensaio foi conduzido em triplicata.

SDS-PAGE e Western Blotting

As amostras protéicas foram resolvidas por SDS-PAGE em gel 12,5% segundo o protocolo descrito por Laemmli (LAEMMLI, 1970). Ao fim da corrida, o perfil eletroforético foi eletrotransferido para uma membrana de nitrocelulose segundo o protocolo descrito por Towbin (TOWBIN *et al.*, 1979). Após a eletrotransferência, a membrana foi incubada com anticorpos Anti-Cry1I e Anti-Cry8 em PBS numa diluição de 1:2000 e 1:5000, respectivamente. Foi utilizado um segundo anticorpo conjugado a fosfatase alcalina (goat anti-rabbit AP).

Cromatografia de exclusão molecular

Foi utilizada uma coluna de 1,20 m x 0,02 m contendo Sephacryl S-200 como matriz. Tampão bicarbonato de amônio (NH₄HCO₃) 0,05M foi utilizado como fase móvel. A cromatografia foi realizada a um fluxo de 0,5mL/min e foram coletadas alíquotas a cada 4 minutos.

Eletroforese Bidimensional

Os extratos protéicos brutos foram resuscitados no tampão de rehidratação (7M uréia, 2M thiourea, 2% CHAPS, 0,5% IPG Buffer 3-10, 65mM DTT). Para a focalização isoeétrica, Immobiline DryStrips de 18cm, pH 3-10 (G.E. Health Care) foram rehidratadas com 350µL de solução de rehidratação contendo 750µg de proteínas. O procedimento foi realizado em um sistema Multiphor II IEF, da Amersham Pharmacia Biotech. As condições elétricas foram as descritas pelo fabricante. Para a segunda dimensão, foi utilizado o sistema Ettan Dalt Six com géis de poliacrilamida 12,5%. As condições elétricas foram as descritas pelo fabricante. Os spots protéicos foram visualizados por coloração com Coomassie Brilliant Blue. Cada experimento foi conduzido em triplicata.

Digestão "in gel" e Espectrometria de Massa

As proteínas de interesse foram excisadas dos géis e digeridas com tripsina (Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade, Promega) seguindo uma modificação do método descrito por Rosenfeld (ROSENFELD *et al.*, 1992). Os hidrolizados tripticos foram adicionados à matrix alfa-ciano na proporção de 1:1 e alíquotas de 1 µL foram aplicadas na placa de amostra de um espectrômetro de massa Ultraflex II - Bruker Daltonics. Para as análises em MS/MS, a tolerância de massa foi estabelecida em 0,15 Da para as massas dos peptídeos precursores. A ferramenta de busca MPsrch foi utilizada para acessar o banco de dados Uniprot com a matrix 250 PAM. Para o Paptide Mass Fingerprint (PMF), a lista de massas foi analisada utilizando-se a ferramenta de busca MASCOT Daemon (Matrix Science, London, UK). As buscas foram conduzidas usando-se acurácia de massa ± 75 ppm. "All taxa" foi escolhido como categoria taxonômica. Resíduos de cisteína carbamidometilados foram considerados como modificações fixas. A busca por homologia foi realizada contra o banco de dados do Siwssprot.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As imagens obtidas por microscopia de contraste de fase permitiram a determinação de quatro estágios do ciclo celular da cepa S811 de *Bt*, sendo eles: 8 horas após a inoculação (HAI) - estágio vegetativo, quando o crescimento exponencial tem início; 16 HAI-início da formação dos esporos; 24 HAI - quando é possível visualizar esporos e cristais dentro da célula e 32 HAI - início do processo de esporulação, quando é possível observar esporos e cristais livres no meio. As proteínas extraídas do sobrenadante e do sedimento da cultura, em cada um desses estágios, foram avaliadas quanto a entomotoxicidade em bioensaios contra larvas de *A. grandis*, os quais mostraram alta atividade às 8 HAI para a fração do sedimento, e às 32 HAI para a fração do sobrenadante (figura 1).

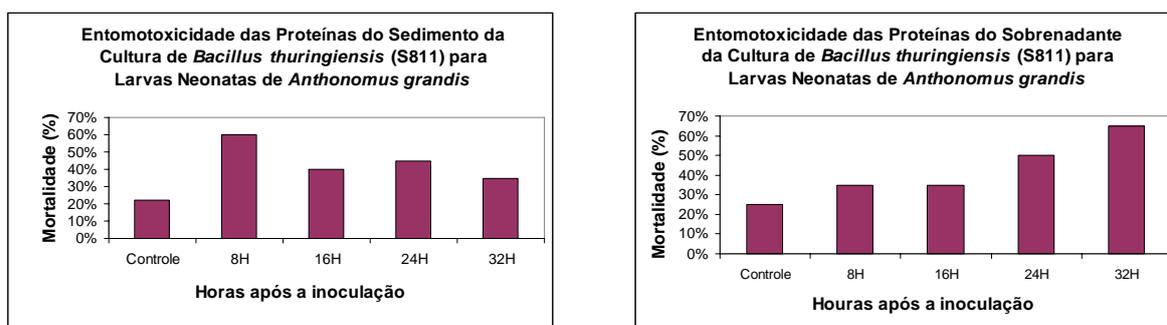


Figura 1: Bioensaio com as frações protéicas do sedimento (A) e do sobrenadante (B) da cultura de *Bacillus thuringiensis* S811 contra larvas neonatas de *Anthonomus grandis*. Foram utilizadas 500 µg de proteínas totais de cada período incorporado a uma dieta artificial.

Por meio dos ensaios de Western blotting, foi possível detectar a presença de proteínas que interagem com o anticorpo anti-Cry8 em todos os estágios da fração do sedimento (figura 2), o que indica que essa molécula começa a ser acumulada em forma solúvel, e não cristalina, ainda nos estágios vegetativos, e que pode estar relacionada com a atividade desta fração contra as larvas de *A. grandis*. Já a toxina Cry1Ia não foi detectada em nenhum dos estágios que apresentavam atividade contra *A. grandis* (figura 2).

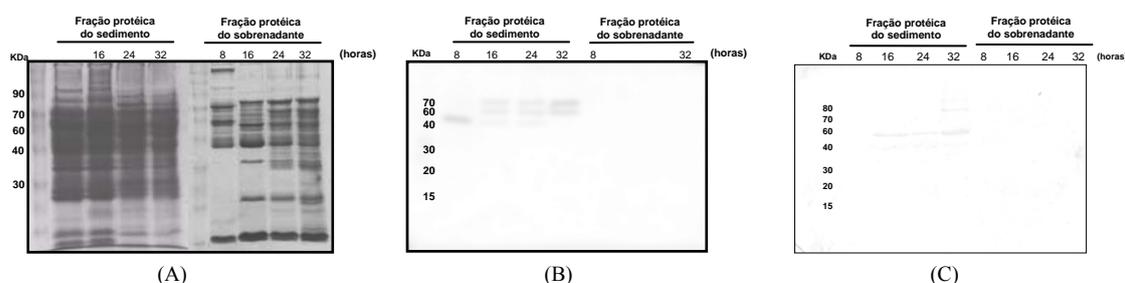
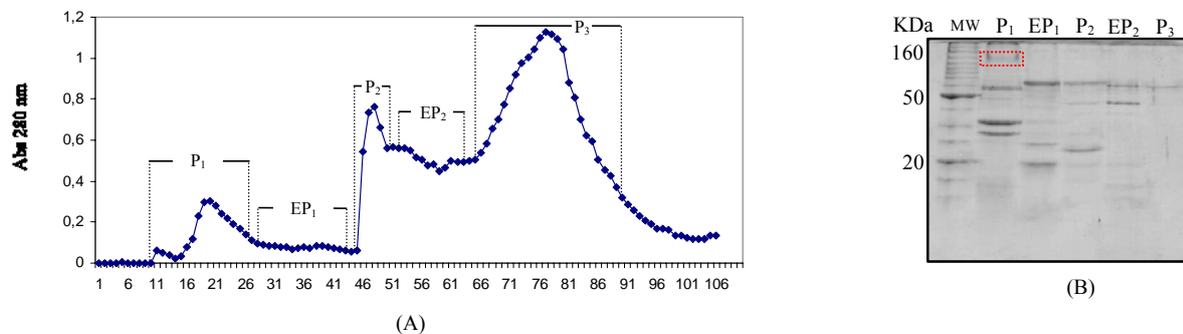


Figura 2: SDS-PAGE das frações protéicas intracelulares e do sobrenadante (A). Western blotting das frações protéicas intracelulares e do sobrenadante utilizando-se anticorpos anti-Cry8 (B). Western blotting das frações protéicas intracelulares e do sobrenadante utilizando-se anticorpos anti-Cry1Ia (C).

De acordo com as análises por Western blotting, a atividade entomotóxica observada às 32 HAI na fração do sobrenadante não pôde ser relacionada à presença de Cry8 nem de Cry11a, sendo devida a uma terceira proteína. A fim de se encontrar novas proteínas responsáveis por essa atividade, esta fração foi subfracionada em cinco regiões, de acordo com o peso molecular, por cromatografia de filtração em gel (figura 3A). Na região de alto peso, P1, foi identificada, por "Peptide Mass Fingerprint", uma proteína de aproximadamente 160kDa, homóloga à Cry1ab (figura 3B, C). A presença de genes para Cry8, Cry11a e Cry1ab já havia sido descrita para a cepa S811 (MARTINS *et al.*, 2007). Neste trabalho, mostramos que, dentre as três toxinas Cry reconhecidamente produzidas por esta cepa, a Cry11a não está relacionada com a atividade entomotóxica para *A. grandis*.



Match to: *CRIAB_BACTA* Score: 209 Expect: 3.3e-16
Taxonomy: *Bacillus thuringiensis* serovar *aizawai*

	Start	End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	Miss	Sequence				
1	NDNNPHEHC	IPYNCLSNPE	VEVLOGGRIE	TGTYPIDISL	SLTQFLLSEF	88 - 93	764.3610	763.3537	763.3864	-43	0	R.IEEFAR.N
51	VPGAGFVLGL	VDIINGIFGP	SQDAFLVQI	EQLINQRIE	FARNQAISRL	88 - 99	1433.7273	1432.7200	1432.7422	-16	1	R.IEEFARQAISR.L
101	EGLSNLQIYI	AESFREWAD	PTNPALHEEM	RIGFNDMNSA	LTTAIPLFAV	116 - 127	1398.7453	1397.7380	1397.6575	58	0	R.EWEADPTPALR.E
151	QNYQVPLLSW	YQOANLHLS	VLRDVSVFQ	RWGFDAATIN	SRYNLTLRLI	174 - 181	907.4628	906.4555	906.4359	-0	0	R.DVSVFQUR.W
201	GHYTDHAVRW	YNTGLRVEWG	PDSRDWIRYN	QRFRELLTV	LDIVSLFPHY	182 - 192	1237.6568	1236.6495	1236.3887	49	0	R.WGFDAATIMSR.Y
251	DSRTYPIRTV	SQLTREIYTN	PVLENFDGSI	RGSAGGIEGS	IRSPHLJHDL	199 - 209	1258.7104	1257.7031	1257.6466	45	0	R.LIGHTYDHAVR.W
301	NSITITTDAN	RGEYYSGHQ	FMASVVGFSG	PEFTFPLYGT	MGNAAPOQRI	210 - 217	1038.5283	1037.5210	1037.4930	27	0	R.WYNTGLR.V
351	VAQLGGGVYR	TLSSTLRYRP	FNIGINNQLG	SVLDTGTEFAY	GTSSNLPDSAV	218 - 224	816.3864	815.3791	815.3926	-17	0	R.VWGPDR.D
401	YRKSQGVDSL	DEIPQNMNV	PPRQGFSHRL	SHVSMFRSGF	SHSSVSIIRA	229 - 233	727.3118	726.3045	726.3449	-56	0	R.YNQFR.R
451	PHFSWIHRSA	EFNNIIPSSQ	ITQIPLTKST	NLGSQTSVVK	GPQFTGGDIL	235 - 253	2195.2709	2194.2636	2194.1521	51	0	R.ELTLVLDIVSLFPHYDSR.T
501	RRTSPQGISI	LRVNITAPLS	QRVVRIRYA	STNLFQFHS	IDGRPINQGN	293 - 311	2197.2299	2196.2226	2196.0997	56	0	R.SPHLMDILNSTITTYDAHR.G
551	FSATHSSGNS	LQSGSFRIVG	FTTPNFNSNG	SSVFTLSAHV	FNSGNEVYID	350 - 360	1203.7351	1202.7278	1202.6772	42	0	R.IVALGGQFTR.Y
601	RIEFVPAEVI	FEAEYDLERA	QKAVNELFTS	SNQIGLRTDV	TDYHIDQVSN	404 - 423	2149.1847	2148.1774	2148.0447	62	0	R.KSGYVDSLDEIPQNMNVPR.Q
651	LVECLSDIEFC	LDEKELSEK	VKHAKRLSDE	RHLLQDPHER	GINRQLDRGW	424 - 429	731.3220	730.3147	730.3511	-50	0	R.QGFSHR.L
701	RGSYDITIQG	GDDVFKENYV	TLTGTFDECY	PTYLYQKIDE	SKLKAYTRTY	430 - 437	976.5243	975.5170	975.4960	22	0	R.LSHVSMR.L
751	LRGYEDSQD	LEIYLIRYNA	RHETVNVPGT	GSLWPLSAPS	PIGKAHSH	438 - 449	1253.6900	1252.6827	1252.6412	33	0	R.SGFSNSVSIIR.A
801	HFSLDIDVGC	TDLNEDLGVV	VIFIKTKTQG	HARLGHLEFL	EEKPLVGEAL	450 - 458	1144.6200	1143.6127	1143.5648	42	0	R.APHFSWIHR.S
851	ARVRAEKRW	RDKRELEWE	TNIVYKEARE	SVDALFVNSQ	YDRLQADTNI	491 - 501	1089.6040	1088.5967	1088.5615	32	0	R.GPQFTGGDILR.R
901	ARIHAADRWR	HSIREAYLPE	LSVYIPGVMAA	IFEELEGRIF	TAFSLYDARN	513 - 522	1098.6575	1097.6502	1097.6193	28	0	R.VNITAPLSQR.Y
951	VIRMGDFMNG	LSCMNVKSHV	DVEEQNHHS	VLVPEPEAE	VSQEVVCPG	602 - 619	2157.1634	2156.1561	2156.0313	58	0	R.IEEFVPAEVIYFEAYDLER.A
1001	ROYLLRVTAY	HEGYEGCVT	THIEKNTDE	LFSMVEVEE	VYFNVYTCN	682 - 690	1116.6271	1115.6198	1115.5723	43	0	R.NLLQDPHER.G
1051	DYATQEEYE	GYTYSRMRG	DGAYESMSSV	PADYASAYEE	KAYTDGRDN	749 - 767	2387.1925	2386.1852	2386.2168	-13	1	R.YQLRGYEDSQDLEIYLIR.Y
1101	PESNRNGYTD	YTPLPAGVTV	KELEYFPETD	KWIEIGETE	GTFIVDSVEL	834 - 852	2098.2749	2097.2676	2097.1470	58	0	R.LGHLEFLVGEALR.V
1151	LMEE					880 - 893	1642.8791	1641.8718	1641.7635	66	0	R.EVDALFVNSQYDR.L
						915 - 938	2616.4454	2615.4381	2615.3482	34	0	R.EAYLPELSPVGVMAAIFEELEGR.I

Figura 3: Cromatograma da fração do sobrenadante às 32 HAI resolvida por cromatografia de filtração em gel (A). De acordo com o cromatograma a amostra foi subfracionada em cinco regiões. Na região de alto peso, P1, uma proteína de 160 KDa (B) foi identificada por "Peptide Mass Fingerprint" como sendo uma Cry1ab de *Bacillus thuringiensis* serovar *aizawai* (C).

Adicionalmente, a fração protéica do sobrenadante às 32 HAI foi resolvida por eletroforese bidimensional (figura 4). Cinco proteínas com padrão de deposição específico para às 32 HAI foram identificadas por espectrometria de massa (MS/MS) e dentre elas uma proteína de ligação à quitina (tabela 1). Essa classe de moléculas é conhecida por apresentar atividade quitinolítica em *Bacillus amyloliquefaciens* (CHU *et al.*, 2001) e essa atividade já foi relacionada à patogenicidade de *Bt* contra insetos (SAMPSON & GOODAY, 1998). Esses dados, somando-se ao fato desta proteína de ligação à quitina ser encontrada em abundância especificamente no estágio letal da fração do sobrenadante, faz dela uma boa candidata a proteína entomotóxica, junto com a Cry1ab, ativa contra *A. grandis* neste estágio.

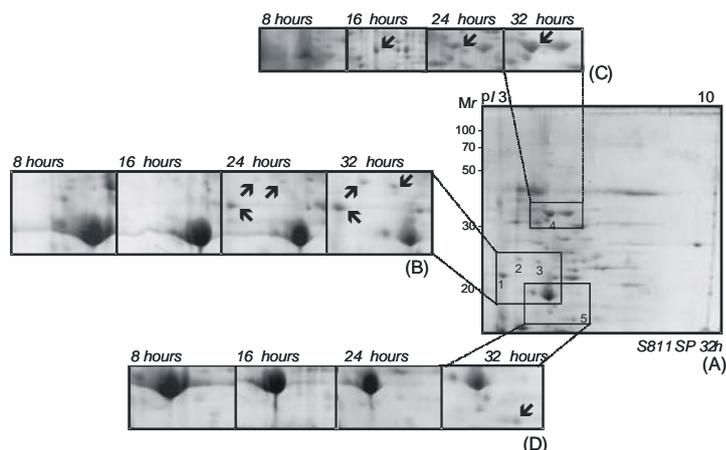


Figura 4: Variação no padrão de deposição de proteínas do sobrenadante durante o crescimento e esporulação de *Bt*. **(A)** 2DE de proteínas do sobrenadante às 32 HAI. Esse estágio apresentou alta atividade contra *A. grandis*. Proteínas específicas deste estágio, ou que se apresentam nele em abundância estão localizadas nos quadrantes. **(B)**, **(C)** e **(D)** mostram a variação na deposição destas proteínas nos demais estágios de crescimento e esporulação do *Bt*.

Tabela 1: Identificação e caracterização de proteínas da fração do sobrenadante. As proteínas foram identificadas por meio do software MPsrch, usando-se o banco de dados Uniprot (<http://www.ebi.ac.uk/MPsrch/>). A massa molecular, (*Mr*) e o ponto isoelétrico (*pI*), "in gel", foram calculados de acordo com a migração relativa. "In silico", *Mr* e *pI* foram determinadas por meio da seqüência protéica completa obtida do banco de dados.

Spot name	Protein	Specie	Accession number	<i>Mr/pI</i> in gel	<i>Mr/pI</i> predicted	Query sequence	Match %	
Supernatant proteins	811SP32H.1	Chitin binding protein	Bacillus cereus	Q736S6	21.80 / 3.30	49.85 / 6.03	DQQTADR	100.0
	811SP32H.2	Putative alcohol dehydrogenase	Oceanicola granulosus	Q2CH29	29.50 / 3.75	34.64 / 5.40	GAEVTSL	100.0
	811SP32H.3	Chaperone protein torD	Salmonella typhi	Q8Z2M3	24.54 / 4.40	23.79 / 4.88	QLLLAI	100.0
	811SP32H.4	ATP synthase subunit beta	Bacillus sp.	Q71CG3	38.90 / 4.80	50.21 / 5.01	TVLIQELININIA QEHGGLSVFA GVGER	96.3
	811SP32H.5	Fructose-bisphosphate aldolase	Bacillus cereus	Q4ML52	14.45 / 5.50	27.99 / 5.16	NLLPYTDSLFL TR	100.0

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRADFORD, M.M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.
- CHU, H.H.; HOANG, V.; HOFEMEISTER, J.; SCHREMPF, H. A *Bacillus amyloliquefaciens* ChbB protein binds b- and a-chitin and has homologues in related strains. **Microbiology**, v.147, p.1793-1803, 2001.
- FEDERICI, B.A. Insecticidal bacteria: An overwhelming success for invertebrate pathology. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.89, p.30-38, 2005.
- GROSSI DE SÁ, M.F.; MAGALHÃES, M.T.Q.; SILVA, M.S.; SILVA, S.M.B.; DIAS, S.C.; NAKASU, E.Y.T.; BRUNETTA, P.S.F.; OLIVEIRA, G.R.; OLIVEIRA-NETO, O.B.; SOARES, L.H.B.; AYUB, M.A.Z.; SIQUEIRA, H.A. AND FIGUEIRA, E.L.Z. Susceptibility of *Anthonomus grandis* (cotton boll weevil) and *Spodoptera frugiperda* (fall armyworm) to a Cry1Ia-type toxin from a Brazilian *Bacillus thuringiensis* strain. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**. (Prelo).
- JAMES, C. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2006. **Executive Summary of Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2006**. ISAAA Briefs No. 34. ISAAA: Ithaca, NY.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of Head of bacteriophage-t4. **Nature**, v.227 (5259), p.680 & ,1970.

MAAGD, R. A. DE.; BRAVO, A.; BERRY, C.; CRICKMORE, N.; SCHNEPF, H. E. Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. **Annual Review in Genetics**, v.37, p.409–33, 2003.

MARTINS, E.S.; PRAÇA, L.B.; DUMAS, V.F.; SILVA-WERNECK, SONE, E.H.; WAGA, I.C.; BERRY, C.; MONNERAT, R.G. Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates toxic to cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*). **Biological Control**, v.40, p.65-68, 2007.

ROSENFELD, J.; CAPDEVIELLE, J.; GUILLEMOT, J.C.; FERRARA, P. In-gel digestion of proteins for internal sequence-analysis after 1-dimensional or 2-dimensional gel-electrophoresis. **Analytical Biochemistry**, v.203 (1), p.173-179, 1992.

SAMPSON, M. N.; GOODAY, G. W. Involvement of chitinases of *Bacillus thuringiensis* during pathogenesis in insects. **Microbiology**, v.144, p.2189-2194, 1998.

SCHMID, R.; BERNHARDT, J.; ANTELMANN, H.; VOLKER, A.; MACH, H.; VOLKER, U.; HECKER, M. Identification of vegetative proteins for a two-dimensional protein index of *Bacillus subtilis*. **Microbiology**, v.143, p.991-998, 1997.

TOWBIN, H.; STAHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets - procedure and some applications. **Proceeding National Academy of Science USA**, v.76 (9), p.4350-4354, 1979.

ESTRATÉGIAS PARA IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE RECEPTORES DO BICUDO DO ALGODOEIRO (*Anthonomus grandis*) PARA TOXINAS CRY

Nakasu, E.Y.T.^{1,2}; Firmino, A.A.P.^{1,3}; Dias, S.C.^{1,3}; Oliveira, G. R.^{1,2}; Grossi-de-Sá, M.F.^{1,3}

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

³UCB – Universidade Católica de Brasília.

alexfirm@gmail.com

RESUMO

As toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis* apresentam atividade inseticida e alto grau de especificidade a certos grupos de insetos, sendo inócuas para vertebrados. Estas características vêm sendo utilizadas no desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas para o controle de pragas economicamente importantes. Atualmente, o inseto-praga de maior importância na cotonicultura é o bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis*), inseto de hábitos larvais endofíticos, e, por isso, de difícil controle. Recentemente, nosso grupo isolou e caracterizou o gene *Cry δ Ha1*, que codifica uma toxina com potencial para o controle desta praga. Esta toxina foi melhorada a partir de técnicas de evolução molecular *in vitro*, apresentando alta toxicidade em bioensaios contra *A. grandis*. Importantes estudos têm sido dirigidos à identificação, purificação e caracterização de receptores de toxinas Cry no intestino de insetos. Embora algumas dessas moléculas tenham sido isoladas e caracterizadas em lepidópteros, estudos para uma melhor compreensão da toxicidade de proteínas Cry ainda são necessários, principalmente em coleópteros. Este trabalho propõe estratégias para o isolamento e caracterização de receptores de toxinas Cry do intestino de *A. grandis*, assim como o estudo de sua interação molecular.

INTRODUÇÃO

O algodão (*Gossypium* spp.) é a principal cultura utilizada para a produção de fibras no mundo, sendo uma das cadeias produtivas mais importantes do Brasil, com incrementos anuais significativos da área cultivada, e uma produção estimada em mais de 3,6 milhões de toneladas para 2007 (CONAB, 2007).

O bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis*) é o inseto-praga mais importante da cotonicultura no Brasil. O controle deste inseto, baseado no uso intensivo de pesticidas químicos é onerosa e difícil, pelo fato dos estádios larvais serem endofíticos. Uma alternativa viável para seu controle é a utilização de plantas transgênicas expressando δ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis*. Durante a etapa de esporulação, esta bactéria produz inclusões cristalinas protéicas, denominadas proteínas Cry, que apresentam atividade inseticida (Bravo *et al.*, 2007).

O mecanismo de ação das proteínas Cry é um processo que pode ser dividido em diferentes etapas (Figura 1). Em um primeiro momento, ocorre a solubilização dos cristais no intestino dos insetos, devido ao pH alcalino, e, conseqüentemente, a liberação de pró-toxinas. Essas pró-toxinas são, então, ativadas por proteases existentes no intestino médio dos insetos pela clivagem das porções N-terminal e C-terminal da proteína, liberando um monômero de aproximadamente 60-70 kDa (Grochulski *et al.*, 1995). O monômero se liga, então, a receptores específicos presentes na região apical da membrana das células do intestino médio do inseto (Bravo *et al.*, 1992). Em lepidópteros, as toxinas Cry1A se ligam a uma aminopeptidase (APN) de 120 kDa, e a proteínas do tipo caderina (Bt-R₁) de 210 kDa em *Manduca sexta* (Vadlamudi *et al.*, 1995). Estudos de interação e especificidade das toxinas Cry com estes receptores revelaram diferenças de afinidade de ligação, sugerindo que o primeiro evento de interação da toxina com as microvilosidades da membrana é a ligação *toxina ativa-caderina Bt-R₁*. Esta ligação provoca uma mudança conformacional, facilitando a clivagem de uma α -hélice (α -1) e levando à formação de uma estrutura tetramérica conhecida como pré-poro (Bravo *et al.*, 2004; Rausell *et al.*, 2004). Este oligômero se liga, então, a uma aminopeptidase, ancorada na membrana por meio de glicosilfosfatidilinositol (GPI), que direciona o complexo para a membrana, causando a inserção e subsequente formação do poro (Bravo *et al.*, 2004).

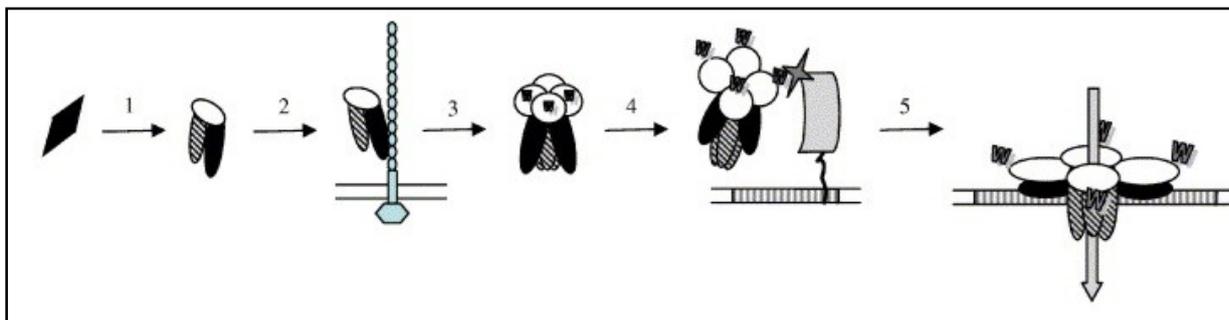


Figura 1. Modo de ação das toxinas Cry. (1) Solubilização e ativação da toxina; (2) Ligação da toxina Cry monomérica no primeiro receptor (Caderinas ou Glicoconjugado), mudança da conformação e clivagem da α -hélice 1; (3) Formação do oligômero; (4) Ligação da toxina oligomérica ao segundo receptor (GPI-Aminopeptidase ou GPI-Fosfolipase). Ocorre uma mudança da conformação e a toxina assume um estágio globular; (5) Inserção da toxina na membrana e formação do poro. (Adaptado de Bravo *et al.*, 2007).

Experimentos de proteção osmótica demonstraram que, após se unirem ao receptor e se inserirem na membrana, as proteínas Cry formam poros com um diâmetro de 1 a 2nm. Assim, as células epiteliais morrem por inativação do sistema que mantém o gradiente de pH e por citólise osmótica (Knowles *et al.*, 1987). O efeito mais devastador desse processo é a alcalinização do citoplasma, interferindo no metabolismo celular normal e, conseqüentemente, destruindo o epitélio intestinal. Uma vez destruídas as células colunares e caliciformes, os esporos de *B. thuringiensis* têm acesso à hemolinfa, causando a morte das larvas por inanição e septicemia.

No caso das toxinas Cry1A, foram descritos pelo menos quatro diferentes receptores (Figura 2): proteínas tipo caderinas, aminopeptidases – já mencionadas acima –, além de uma fosfatase alcalina e um glicoconjugado de 270kDa (Budatha *et al.*, 2007; Ingle *et al.*, 2001; Garner *et al.*, 1999; Hara *et al.*, 2003; Gomez *et al.*, 2007).

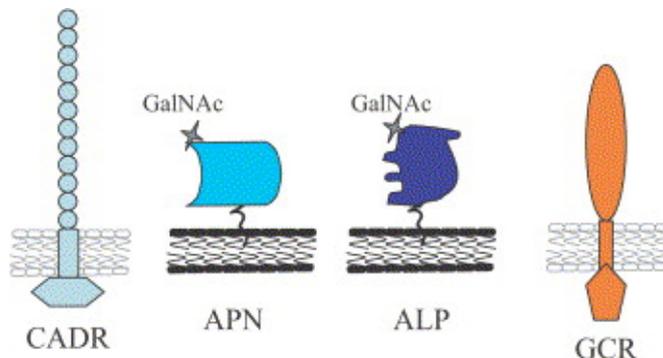


Figura 2. Moléculas receptoras das proteínas Cry1A. CADR, receptor tipo caderina; APN, Aminopeptidase N; ALP, Fosfatase Alcalina; GCR, receptor glicoconjugado. (Bravo *et al.*, 2007).

A maior ameaça ao uso de toxinas Cry é o desenvolvimento de resistência nos insetos. Os mecanismos mais freqüentes de resistência a toxinas Cry são defeitos nas interações toxina-receptores (Ferré *et al.*, 2002). A caracterização de moléculas de receptores em diferentes insetos-praga é vital para entender o modo de ação destas toxinas. A partir do isolamento e caracterização do gene *cry8Ha1* da cepa *B. thuringiensis*, linhagem 811, que codifica uma toxina com potencial para controle de *A. grandis*, uma biblioteca de genes recombinados foi desenvolvida por meio do uso das técnicas *DNA shuffling* e *Phage display*. Uma seleção permitiu o isolamento de mutantes melhorados, expressando toxinas altamente específicas ao bicudo-do-algodoeiro. As toxinas que apresentaram maior porcentagem de mortalidade em bioensaios com larvas de bicudo serão utilizadas para a identificação e caracterização de receptores. A identificação de epitopos de ligação da toxina com os diferentes receptores ajudarão no desenvolvimento de estratégias para lidar com o problema potencial de resistência e de novas toxinas com alta especificidade.

MATERIAL E MÉTODOS

Insetos

As larvas de bicudo do algodoeiro utilizadas neste estudo são provenientes do Laboratório de Criação de Insetos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Os insetos são mantidos sob dieta artificial em câmaras climatizadas a 25 ° C, 60% de U.R. e fotoperíodo de 12 horas.

Expressão e purificação da toxina Cry8Ha1 recombinante em sistema homólogo

Foi construída uma biblioteca combinatória utilizando-se um gene codificador para toxina cry8Ha1, isolado e caracterizado no Laboratório de Interação Molecular Planta-Praga da Embrapa-Cenargen. Este gene *cry8Ha*, isolado da cepa 811 de *B. thuringiensis* pertencente ao Banco de *Bacillus* Entomopatogênicos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, codifica uma proteína com atividade inseticida contra o bicudo do algodoeiro (Grossi-de-Sá, 2007). No desenvolvimento desta biblioteca combinatória, foram utilizadas as tecnologias de *DNA shuffling* (Stemmer, 1994; Zhao *et al.*, 1998; Volkov *et al.*, 2000; Coco *et al.*, 2001) e *Phage display* (Smith, 1985).

Foram escolhidos, aleatoriamente, 30 genes *cry* mutantes, os quais foram seqüenciados e selecionados por meio de bioensaio contra bicudo, comparando-os com a atividade inseticida da proteína original. O gene da toxina com maior atividade contra o bicudo está sendo expresso em vetor bacteriano pEt Directional TOPO cloning (Invitrogen) e introduzido em células de *E. coli* BL21(De) Star (Invitrogen). A proteína recombinante, após purificação em coluna de níquel (Ni), será utilizada para produção de anticorpo policlonal em coelho, para os ensaios de Western Blot, colunas de afinidade e caracterização dos receptores.

Purificação de receptores de toxinas Cry do intestino de A. grandis

Gel Bidimensional de BBMV de A. grandis

As proteínas periféricas do epitélio intestinal "Brush Border Membranes Vesicles" (BBMV) do bicudo do algodoeiro foram extraídas segundo Biber *et al.* (1981). A primeira estratégia utilizada para a identificação de prováveis receptores será a análise proteômica por meio de eletroforese bidimensional. Caso seja necessária, será feita uma separação prévia das BBMV por métodos cromatográficos, como, por exemplo, cromatografia de afinidade em coluna previamente preparada com a toxina Cry8Ha1 recombinante. Após a coleta das frações, o perfil será analisado em SDS-PAGE (Laemmli, 1970) e géis bidimensionais. Para efetuar a caracterização bidimensional, os *spots* de interesse serão analisados em MALDI-TOF e, posteriormente, terão seu N-terminal seqüenciado. A análise dos mapas peptídicos gerados por espectrometria de massa utilizará o programa Mascot. A seqüência N-terminal das proteínas será analisada no Programa Blast para obtenção de proteínas similares, e alinhadas no Programa Clustalw. Primers correspondentes às regiões N e carboxiterminal serão construídos e utilizados nos experimentos que visam o isolamento de genes de receptores.

Identificação por Western Blotting

A segunda estratégia a ser utilizada é a aplicação das BBMV de intestino de bicudo, devidamente quantificadas, em gel de SDS-PAGE e, em seguida, transferidas para membranas de PVDF por meio da técnica de Western Blot. A membrana será incubada com as toxinas e após lavagem, será incubada em solução de anticorpo anti-toxinas e, depois, com anticorpo secundário marcado com fosfatase alcalina. Posteriormente, a seqüência N-terminal do possível receptor será determinada.

Isolamento de receptores por Ressonância Plasmônica de Superfície

A toxina Cry8Ha1 recombinante, ativada por digestão com tripsina bovina será imobilizada em um *microchip* e em seguida, as proteínas periféricas do epitélio intestinal (BBMV) do bicudo do algodoeiro serão adicionadas ao *microchip*. Os valores de ressonância serão utilizados para a determinação das constantes cinéticas de associação e dissociação da interação proteínas Cry-receptor. As proteínas que apresentarem interação com as toxinas Cry serão eluídas do *microchip*, submetidas a um fracionamento em HPLC (exclusão molecular e/ou fase reversa) e os picos protéicos resultantes serão seqüenciados e analisados por espectrometria de massa, conforme descrito anteriormente.

Construção de uma Biblioteca de ESTs de intestino de A. grandis

Intestinos de larvas de 3º instar foram utilizadas para a obtenção de RNA total utilizando Trizol[®], de acordo com informações do fabricante (Invitrogen). Para a obtenção de mRNA, foi utilizado o kit Oligotex for polyA⁺ RNA Purification (QIAGEN). A biblioteca de EST está sendo construída utilizando o kit Creator SMART cDNA Library Construction (Clontech Laboratories, Inc).

REFERÊNCIAS

- BIBER, J; STIEGER, B; HASSE; MURER, H. High yield preparation for rat kidney brush border membranes. Different behavior of lysosomal markers. **Biochemica et Biophysica Acta**, v. 647, n. 2:169-176. 1981.
- BRAVO, A., SANCHEZ, J., KOUSKOURA, T., CRICKMORE, N. N-terminal activation is an essential early step in the mechanism of action of the *B. thuringiensis* Cry1Ac insecticidal toxin. **Journal of Biological Chemistry**, 277, 23985–23987. 2002.
- BRAVO, A., GOMEZ, I., CONDE, J., MUNOZ-GARAY, C., SANCHEZ, J., ZHUANG, M., GILL, S.S., SOBERON, M. Oligomerization triggers differential binding of a pore-forming toxin to a different receptor leading to efficient interaction with membrane microdomains. **Biochemica et Biophysica Acta**, 1667, 38–46. 2004.
- BRAVO, A., GILL, S.S., SOBERON, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt and their potential for insect control. **Toxicon**, In Press. 2007.
- BUDATHA, M, MEUR, G; DUTTA-GUPTA, A. A novel aminopeptidase in the fat body of the moth *Achaea janata* as a receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry toxins and its comparison with midgut aminopeptidase. **Biochemical Journal**, In press. 2007.
- 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**, 19: 354-359. 2001.
- CONAB - Companhia Nacional de Desenvolvimento. Sétimo Levantamento de Avaliação da Safra 2006/2007 (Abril/2007). In: **Associação Brasileira dos Produtores de Algodão**.
http://www.abrapa.com.br/multissitios_abrapa/publicacao/engine.wsp?tmp.area=4832007.
- FERRÉ, J; VAN RIE, J. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology**, 47, 501-533. 2002.
- GARNER, K.J., HIREMATH, S., LEHTOMA, K., VALAITIS, A.P. Cloning and complete sequence characterization of two gypsy moth aminopeptidase-N cDNAs, including the receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. 29(6):527-35. 1999.
- GOMEZ, I.; PARDO-LOPEZ, L.; MUÑOZ-GARAY, C.; FERNANDEZ L.E.; PÉRES, C.; SANCHES J.; SOBERÓN, BRAVO, A. Role of receptor interaction in the mode of action of insecticidal Cry and Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*. **Peptides**, 28, 169-173. 2007
- GROCHULSKI, P., MASSON, L., BORISOVA, S., PUSZTAI-CAREY, M., SCHWARTZ, J.L., BROUSSEAU, R., CYGLER, M. *Bacillus thuringiensis* CryIA (a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. **Journal Molecular Biology**, 254, 447–464. 1995.
- GROSSI-DE-SÁ, M.F.; MAGALHÃES, M.T.Q.; SILVA, M.S.; SILVA, S.M.B.; DIAS, S.C.; NAKASU, E.Y.T.; BRUNETTA, P.S.F.; OLIVEIRA, G.R.; OLIVEIRA-NETO, O.B.; SOARES, L.H.B.; AYUB, M.A.Z.; SIQUEIRA, H.A.; FIGUEIRA, E.L.Z. Susceptibility of *Anthonomus grandis* (cotton boll weevil) and *Spodoptera frugiperda* (fall armyworm) to a Cry1Ia-type toxin from a Brazilian *Bacillus thuringiensis* strain. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, In press. 2007.
- HARA, H., ATSUMI, S., YAOI, K., NAKANISHI, K, HIGURASHI, S., MIURA, N., TABUNOKI, N. & SATO, R. A cadherin-like protein functions as a receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa and Cry1Ac toxins on midgut epithelial cells of *Bombyx mori* larvae. **FEBS Letters**, 538: 29-34. 2003.
- INGLE, S.S., TRIVEDI, N., PRASAD, R., KURUVILLA, J., RAO, K.K., CHHATPAR, H.S. Aminopeptidase-N from the *Helicoverpa armigera* (Hubner) brush border membrane vesicles as a receptor of *Bacillus thuringiensis* cryIac delta-endotoxin. **Current Microbiology**. V. 43, n.4, p. 255-259, 2001.
- KNOWLES, B. H; ELLAR D. J. Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus-thuringiensis* delta-endotoxins with different insect specificity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 924, n.3, p. 509-518, 1987.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- RAUSELL, C., MUÑOZ-GARAY, C., MIRANDA-CASSOLUENGO, R., GMEZ, I., RUDIÑO-PIÑERA, E., SOBERÓN, M., BRAVO, A. Tryptophan spectroscopy studies and black lipid bilayer analysis indicate that the oligomeric structure of Cry1Ab toxin from *Bacillus thuringiensis* is the membrane insertion intermediate. **Biochemistry**, v.43, p. 166–174. 2004.
- 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. **Proceedings National Academy Sciences. USA**, v. 91, p. 10747-10751. 1994.
- VADLAMUDI, R.K., WEBER, E., JI, I., JI, T.H., BULLA JR., L.A. Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. **Journal Biological Chemistry**, v. 270, 5490–5494. 1995.

VOLKOV, A.A.; SHAO, Z.AND ARNOLD, F.H. Random chimeragenesis by heteroduplex recombination. **Methods Enzymology**, v. 328, p. 456-463. 2000.

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.

AValiação DE BIOSSEGURANÇA ALIMENTAR DAS TOXINAS Cry1Ia12 e Cry8Ha1 EM MAMÍFEROS

Guimarães, L.M.^{1,2}; Muchagata, R.C.C.¹; Fragoso, R.R.³; Quezado, M.^{1,2}; Vasconcelos, I.⁴; Grossi-de-Sá, M.F.¹

¹EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia; ²UnB - Universidade de Brasília; ³EMBRAPA Cerrados;

⁴UFC- Universidade Federal do Ceará.

lucianemg@yahoo.com.br

RESUMO

Com a aprovação do plantio de Organismos Geneticamente Modificados (OGM) no Brasil, e com a aprovação da Lei de Biossegurança/2005, tornou-se ainda mais necessário ampliar e efetivar os estudos toxicológicos de proteínas expressas em cultivares transgênicos de interesse econômico, a fim de garantir a segurança alimentar humana e animal. Os genes *cry*, denominados *cry1Ia12* e *cry8Ha1*, obtidos a partir de uma estirpe de *Bacillus thuringiensis* (Quezado, 2006; GROSSI-DE-SÁ *et al.*, 2007), estão sendo introduzidos em plantas de algodão com o intuito de gerar plantas resistentes ao ataque de insetos-praga, reduzindo desta forma o uso indiscriminado de pesticidas e aumentando a qualidade do produto final. Nesse contexto, testes toxicológicos e histopatológicos são necessários para avaliar o impacto das proteínas entomotóxicas Cry1Ia12 e Cry8Ha1 em mamíferos. Esses resultados fornecerão subsídios nas discussões sobre transgênicos, além de permitirem aos consumidores a certeza de alimentos seguros. Dessa forma, foi estabelecido e otimizado um sistema de expressão heteróloga e purificação de entomotoxinas em larga escala, objetivando produzir moléculas puras, numa ordem de grandeza de centenas de miligramas, para a realização dos ensaios toxicológicos em mamíferos.

INTRODUÇÃO

O setor agrícola mundial se inseriu na era da moderna biotecnologia, aderindo ao cultivo de plantas geneticamente modificadas (GM). As características introduzidas incluem, principalmente, resistência a insetos e tolerância a herbicidas, além do aumento dos valores nutricionais e da produção de fármacos. Os países que adotaram a tecnologia apresentaram incremento na produtividade e redução no custo de produção (JAMES, 2002). Tal fato pode ser evidenciado pelo rápido crescimento anual da área global cultivada com plantas GM. Segundo o relatório divulgado pelo Serviço Internacional para a Aquisição de Aplicações Agrobiotecnológicas (ISAAA), a área mundial plantada com variedades geneticamente modificadas em 2006 superou a marca de 100 milhões de hectares (JAMES, 2006).

Mesmo em muitos países, como o Brasil que tem hoje a terceira maior área plantada de transgênicos do mundo existe a preocupação com relação às questões de biossegurança e bioética. As prováveis conseqüências geradas pelo uso da engenharia genética levantam questionamentos a respeito do exercício dessa atividade em laboratório e, principalmente, aos potenciais riscos resultantes do plantio de transgênicos ao meio ambiente e à saúde humana. O ponto fundamental destes questionamentos baseia-se no fato da engenharia genética permitir a transferência de informações genéticas entre espécies de gêneros, famílias e, até mesmo, reinos distintos. Estas combinações, até então incompatíveis, geram preocupações com relação às situações riscos.

Ao longo da última década, o grupo de pesquisa de Interação Molecular Planta-Praga (LIMPP), da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, vem desenvolvendo estratégias moleculares para o controle de insetos-praga de culturas de importância econômica. Muitas moléculas foram isoladas e testadas contra seus alvos principais e já estão sendo introduzidas em plantas de interesse.

Dentre as moléculas em estudo destacam-se as toxinas Cry (δ -endotoxinas), provenientes da bactéria Gram-positiva *Bacillus thuringiensis*, que vem sendo utilizada ao longo das últimas décadas como agente de controle biológico de pragas agrícolas e vetores de doenças, devido a seus vários mecanismos de virulência específicos e eficazes (FIÚZA *et al.*, 2000). Seu modo de ação difere completamente do modo de ação dos pesticidas químicos, fazendo das toxinas Cry componentes-chave para a geração de transgênicos, preservando os inimigos naturais e permitindo o manejo de resistência (BETZ *et al.*, 2000). Como um dos principais objetivos do grupo de pesquisa do LIMPP é obter plantas de algodão que expressem toxinas Cry visando obter algodão resistente ao ataque de insetos praga, faz-se necessária a avaliação de biossegurança das novas toxinas Cry. Os estudos serão realizados por meio de ensaios toxicológicos, bem como exames histopatológicos em camundongos alimentados com as toxinas com as proteínas Cry1Ia12 e Cry8Ha1. Dessa forma, foi estabelecido e otimizado um sistema de expressão e purificação em larga escala, com o objetivo de se obter grandes quantidades de proteína pura para a realização dos ensaios toxicológicos em mamíferos.

MATERIAL E MÉTODOS

Construção dos vetores de expressão contendo os genes cry1Ia12 e cry8Ha1

Foram desenhados oligonucleotídeos com base no códon de iniciação (ATG) dos genes, com adição da seqüência CACC na região 5' do oligonucleotídeo em orientação "sense". A amplificação foi realizada por PCR e o produto da amplificação foi separado por eletroforese em gel de agarose 1,0% e purificado. Os fragmentos gênicos purificados representados esquematicamente (Figura 1A e 1B) foram posteriormente ligados no vetor pET101 do sistema pET Directional TOPO Cloning (Invitrogen) (Figura 1C). O oligonucleotídeo "antisense" não tem o códon de terminação, o qual se encontra logo após a cauda de poli-histidina.

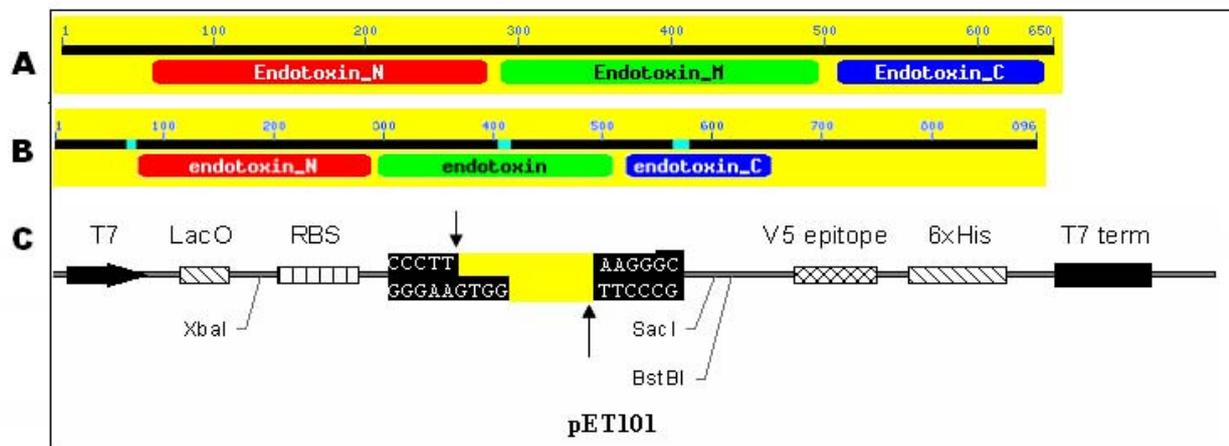


Figura 1: Representação esquemática dos vetores de expressão pET101/cry1Ia12 e pET101/cry8Ha1. Os fragmentos gênicos (A) *cry1Ia12*; (B) *cry8Ha1*; foram ligados (C) no vetor pET101 do sistema pET Directional TOPO Cloning (Invitrogen).

Expressão dos genes *cry1Ia12* e *cry8Ha1* em *Escherichia coli*

Células de *E. coli* BL21-Star (DE), foram transformadas com as construções dos vetores de expressão pET101/*cry1Ia12* e pET101/*cry8Ha1*. A seleção das colônias contendo vetor de interesse foi realizada pela resistência ao antibiótico ampicilina. Para a verificação dos clones positivos foram realizados PCR de colônia utilizando as mesmas condições descritas para a amplificação dos genes. A indução da expressão foi realizada com a adição de IPTG na concentração de 1mM a 37° C por 18 horas (Figura 2 e 3).

Purificação das toxinas recombinantes Cry1Ia12 e Cry8Ha1 recombinantes

Para purificação das toxinas obtidas na expressão foi realizada uma cromatografia de afinidade com a resina Ni-NTA (QUIAGEN). A resina foi empacotada em uma coluna de vidro e equilibrada com 4 volumes da coluna com solução de equilíbrio (50mM tampão fosfato, 300mM NaCl, 10mM imidazol, pH 7.8). A amostra foi adicionada e, posteriormente, o sistema foi lavado com 6 volumes da coluna com solução de lavagem (50mM tampão fosfato, 300mM NaCl, 20mM imidazol, pH 7.8). Finalmente, a proteína foi eluída com dois volumes da coluna de tampão de eluição (50mM tampão fosfato, 300mM NaCl, 250mM imidazol, pH 7.8). As amostras foram quantificadas por Lowry e dialisadas. As proteínas Cry1Ia12 e Cry8Ha1 purificadas foram visualizadas no gel de poliácridamida desnaturante 12% e corados com Coomassie Brilliant Blue R-250 (Figura 2 e 3).

Ensaio Biológicos

Nos ensaios biológicos serão utilizados 30 ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus* Var. albinus, Rodentia), recém desmamados, com 21-23 dias de idade, pesando entre 30-40g. No experimento visando avaliação da toxicidade das proteínas já mencionadas, será utilizado um delineamento experimental inteiramente casualizado com três tratamentos (T₁, T₂, T₃) e dez repetições, considerando cada animal uma repetição. O tratamento T₁ será o controle negativo, T₂ será constituído com a toxina Cry1Ia12 e T₃ com a toxina Cry8Ha1. As dietas a serem utilizadas serão formuladas de acordo com a composição básica preconizada para ensaio com rato, descrita no método 960.48 da *Association of Official Analytical Chemists*. O ensaio terá duração de 28 dias, em ambiente com temperatura controlada (aproximadamente 24° C), com períodos alternados de luz a cada 12 horas. Água e ração serão fornecidos *ad libitum* durante todo período experimental, determinando-se diariamente a pesagem dos ratos e o consumo de ração, além da coleta de fezes e urina. Nas amostras de fezes e urina, serão determinados o teor de nitrogênio, para posterior avaliação das propriedades nutricionais da ração contendo ou não as

proteínas descritas acima. Entre os parâmetros para avaliar as propriedades toxicológicas, será determinada a relação de eficiência protéica (PER), quociente de eficiência líquida da proteína (NPR), utilização líquida da proteína (NPU), coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) e verdadeiro (CDV), valor biológico (VB) e balanço de nitrogênio aparente (BNA).

Os dados obtidos serão submetidos à análise de variância e teste de Tukey, no programa SAS System (SAS Institute, 1989), a fim de avaliar diferenças entre as médias dos tratamentos. Após o término dos ensaios biológicos, os ratos serão sacrificados para a retirada de órgãos, a fim de submetê-los ao exame histopatológico avaliando os efeitos de cada proteína mencionada, tendo como parâmetro de comparação o tratamento isento das proteínas a serem avaliadas. O exame histopatológico será realizado segundo técnicas de rotina descrita por WILLY & VANRELL (1970).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimentos foram conduzidos em células de *E. coli* BL21-Star (DE), transformadas com as construções dos vetores de expressão *pET101/cry11a12* e *pET101/cry8Ha1*. A expressão da proteína recombinante Cry11a12 em larga escala vem sendo obtida com sucesso no sistema heterólogo pET (*E. coli*), encontrando-se ativa e na fração solúvel do extrato celular. Porém, inicialmente, foi observado um grande acúmulo de proteína na forma de corpos de inclusão no interior da célula. Dessa forma, buscou-se uma metodologia na qual se utilizava lisozima no tampão de extração, aumentando a quantidade de proteína na fração solúvel, o que permitiu a utilização dessa metodologia na produção em larga escala. Diferentemente da proteína Cry11a12, a proteína Cry8Ha1 não foi observada na forma de corpos de inclusão. Após 16 horas de expressão, uma grande quantidade de Cry8Ha1 se encontrava na fração solúvel do extrato celular.

As proteínas Cry11a12 e Cry8Ha1 estão em fase de purificação a fim de se obter 100mg de proteína pura de cada uma dessas toxinas. Durante esse procedimento, foram produzidos 40mg da proteína Cry11a12 e 50mg da proteína Cry8Ha1, respectivamente. Os restantes dessas toxinas estão sendo providenciados em constantes processos de purificações. Ao final de cada expressão e purificação, as proteínas Cry11a12 e Cry8Ha1 são visualizadas no gel de poliacrilamida desnaturante 12% e corados com coomassie brilliant blue R-250 (Figura 2 e 3).

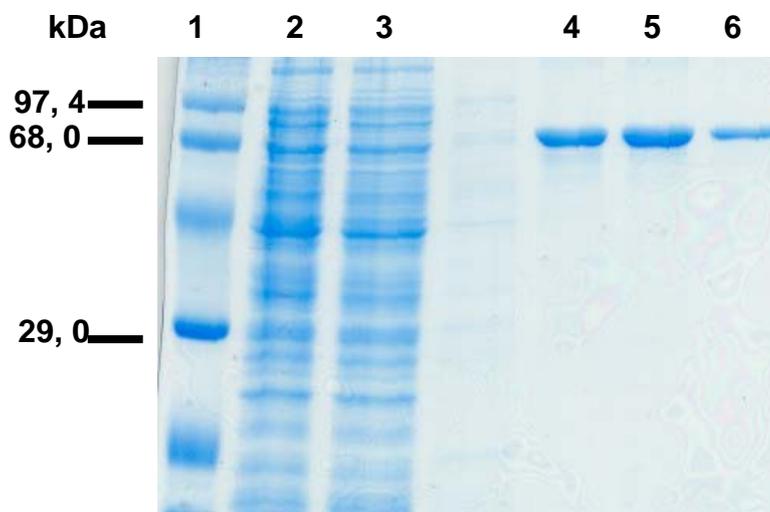


Figura 2: Análise por SDS-PAGE da proteína recombinante Cry8Ha1 purificada por cromatografia de afinidade (Ni-NTA). (1) Marcador de peso molecular; (2) Extrato total da *E. coli* expressando a proteína recombinante Cry8Ha1; (3) Fração não retida na resina Ni-NTA; (4, 5 e 6) Proteína Cry8Ha1 eluída da resina Ni-NTA em diferentes concentrações para confirmação do grau de pureza.

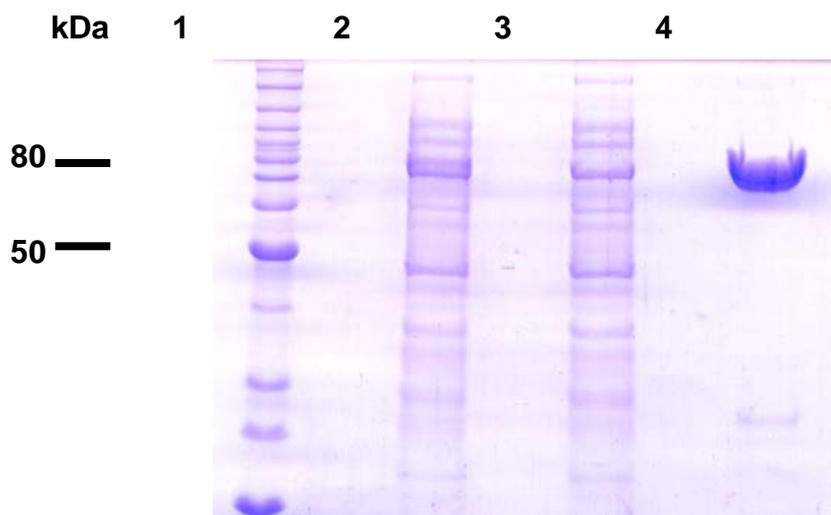


Figura 3: Análise por SDS-PAGE da proteína recombinante Cry1Ia12 purificada por cromatografia de afinidade (Ni-NTA). (1) Marcador de peso molecular; (2) Extrato total da *E. coli* expressando a proteína recombinante Cry1Ia12; (3) Fração não retida na resina Ni-NTA; (4) Proteína Cry1Ia12 eluída da resina Ni-NTA para confirmação do grau de

PERSPECTIVAS

Serão preparadas dietas contendo as proteínas Cry1Ia12 ou Cry8Ha1 para a realização de ensaios toxicológicos, bem como exames histopatológicos nos camundongos alimentados com as toxinas purificadas, e descritas nesse trabalho, para a geração de resultados, os quais poderão elucidar o impacto das proteínas Cry1Ia12 e Cry8Ha1 em sistemas biológicos, fornecendo subsídios nas discussões sobre transgênicos, além de permitirem aos consumidores a certeza de alimentos seguros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A.O.A.C. Association of Official Analytical Chemists – Official **Methods of Analysis**. Kenneth Helrich. Arlington, Virginia. Volume Two. 1995. 1298p.
- BABU, R.M.; SAJEENA, A.; SEETHARAMAN, K.; REDDY, M.S. Advances in genetically engineered (transgenic) plants in pest management – an over view. **Crop Protection**, v.22, p.1071-1086, 2003.
- BETZ, F.S.; HAMMOND, B.G.; FUCHS, R.L. Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis*-protected plants to control insect pests. **Regulatory, Toxicology and Pharmacology**, San Diego, v.32, p.156-173, 2000.
- CTNBio – Comissão técnica nacional de biossegurança. www.ctnbio.gov.br.
- FAO. FAO yearbook, production. Vol. 45. FAO Statistics Series n.104, Rome; Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2001, p. 61-184.
- FIUZA, L.M. Binding of *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxins to the midgut brush border membrane vesicles of *Chilo suppressalis* (Lepidoptera:Pyralidea): evidence of shared binding sites. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.62, n.5, p.1544-1549, 1996.
- JAMES, C. Global status of commercialized transgenic crops. **ISAA**, 2006.
- JAMES, C. Global Status of Commercialised Transgenic Crops **ISAAA** Briefs No.32: Preview. ISAAA, Ithaca, NY, 2004
- HANSEN, B. M.; ALAMITOUS, S. Virulence of *Bacillus thuringiensis*. Kluwer Academic Publishers. In Entomopathogenic Bacteria: From **Laboratory to Field Application**. p. 41-64 , 2000.
- GROSSI-DE-SÁ MF.; QUEZADO M.T.M.; SILVA M.S.; SILVA S.M.B.; DIAS S.C.; NAKASU E.Y.T.; BRUNETTA P.S.F.; OLIVEIRA G.R.; OLIVEIRA O.B.N.; OLIVEIRA .R.S.; SOARES L.H.B.; AYUB M.AZ.; SIQUEIRA H.A.; FIGUEIRA E.L.Z. Susceptibility of *Anthonomus grandis* (cotton boll weevil) and *Spodoptera frugiperda* (fall armyworm) to a Cry1Ia-type toxin from a Brazilian *Bacillus thuringiensis* strain. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**. Aceito, 2007.
- QUEZADO, M. Toxinas Cry: Perspectivas para obtenção de algodão transgênico brasileiro. Dissertação de Mestrado. UFRGS. 2006.
- WILLY, B.; VANRELL, J.P. **Técnicas de citologia e histologia**. 1 ed. São Paulo, Livraria Nobel S.A., p. 27-147, 1970.

PROSPECÇÃO DE MOLÉCULAS DE PLANTAS NATIVAS DO CERRADO COM ATIVIDADE CONTRA O FUNGO CAUSADOR DA RAMULOSE DO ALGODOEIRO

Murad, A.M.¹; Rocha, T.L.¹; Silva, M. S.²; Lacerda, A.F.¹; Espindola, L.S.³; Suassuna, N.D.⁴; Charchar, M.J.A.²; Anjos, J.R.N.²; Grossi-de-Sá, M.F.¹

¹EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia; ²EMBRAPA Cerrados; ³UnB - Universidade de Brasília; ⁴EMBRAPA Algodão.

alinemelo@gmail.com

RESUMO

O Brasil é um grande produtor de algodão, com destaque para a região Centro-Oeste, que contribui com cerca de 60% da produção nacional, sendo responsável por aproximadamente 50% da área plantada com algodoeiro. Dentre as doenças fúngicas do algodoeiro, a ramulose, causada por *Colletotrichum gossypii* (South), var. cephalosporioides A. S. Costa, está entre as mais prejudiciais, e encontra-se disseminada em praticamente todo o Brasil, causando sérios problemas nos Estados do Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e em algumas localidades do Nordeste. A ramulose não é satisfatoriamente controlada por meio da aplicação de fungicidas sintéticos, o que representa um fator limitante na maioria das regiões produtoras de algodão no Brasil. O controle desta patologia requer o uso de grandes quantidades de defensivos agrícolas, os quais causam sérios problemas, como a contaminação do meio ambiente, a intoxicação de produtores, a indução de resistência e o aumento dos custos de produção. Diante desse cenário, torna-se fundamental a busca por alternativas que contribuam para o controle sustentável da ramulose do algodoeiro no Brasil. Neste trabalho, é apresentada a avaliação de atividade antimicrobiana de extratos de diferentes órgãos (caule, raiz, folha e fruto) das espécies nativas do Cerrado *Guarea kunthiana*, *Guarea guidonea* e *Solanum lycocarpum* contra o fungo causador da ramulose do algodoeiro. Dentre os extratos testados, apenas o extrato aquoso de sementes de *S. lycocarpum* apresentou atividade contra o crescimento micelial de *C. gossypii*, var. cephalosporioides. Serão realizadas a identificação e o isolamento desses princípios antifúngicos hidrossolúveis de *S. lycocarpum*, assim como a análise de citotoxicidade sobre células de mamíferos, termoestabilidade e especificidade de sua atividade. O presente trabalho abre perspectivas de desenvolvimento de defensivos agrícolas economicamente e ambientalmente sustentáveis para o controle da ramulose do algodoeiro.

INTRODUÇÃO

O Brasil é um grande produtor de algodão, destacando-se a região Centro-Oeste, principalmente os Estados do Mato Grosso (MT), Mato Grosso do Sul (MS) e Goiás (GO). O Centro-Oeste contribui com cerca de 60% da produção nacional de algodão, sendo responsável por 50% da área plantada com algodoeiro no país (IBGE, 2006). Dentre as doenças fúngicas do algodoeiro, a ramulose, causada por *Colletotrichum gossypii* (South), var. cephalosporioides A. S. Costa, está entre as mais prejudiciais no Brasil e encontra-se disseminada em praticamente todo o país, causando sérios problemas nos Estados do MT e MS e em algumas localidades do Nordeste (IAMAMOTO, 2003). A ramulose não é satisfatoriamente controlada por meio da aplicação de fungicidas sintéticos, e isso pode ser um fator limitante na maioria das regiões produtoras de algodão no Brasil. O controle da ramulose requer o uso de grandes quantidades de defensivos agrícolas, os quais são responsáveis pela indução de resistência, contaminação do meio ambiente e intoxicação de produtores, além do aumento dos custos de produção.

Diante desse cenário, fica clara a necessidade de alternativas que contribuam para o controle sustentável da ramulose do algodoeiro no Brasil. Dentre as possíveis soluções, uma das mais eficientes e favoráveis do ponto de vista econômico e ambiental é a resistência genética. Entretanto, no caso da ramulose, existem poucas fontes de resistência dentro dos *pools* gênicos do algodoeiro. As fontes de resistência de algodoeiro a ramulose são em geral determinadas por um ou poucos genes (ZANDONÁ *et al.*, 2006) e têm evidenciado baixa durabilidade em condições de campo. Ademais, a introdução de resistência poligênica durável em variedades comerciais de culturas como o algodoeiro é laboriosa e demorada.

Os produtos químicos sintéticos mais utilizados no controle de pragas agrícolas têm sido os organofosforados, organoclorados, carbamatos e piretróides (VIEIRA *et al.*, 2001). Vários desses produtos químicos sintéticos foram desenvolvidos a partir de seus análogos naturais produzidos por plantas. Por exemplo, flores de crisântemo (*Chrysanthemum* sp., família *Asteraceae*), inseticida do século XVII, deu origem ao piretro, utilizado até 1950, quando foi substituído por seus análogos químicos sintéticos. Em feijão Calabar ou feijão Ordeal (*Physostigma venenosum*, família *Fabaceae*), foi identificado o alcalóide fisostigmina, modelo molecular para o desenvolvimento dos carbamatos (BALANDRIN *et al.*, 1985). A rotenona, isolada da raiz de timbó (*Derris urucu*, família *Fabaceae*) (GUSMÃO *et al.*, 2002), é altamente tóxica para insetos e também deu origem a análogos sintéticos (VIEIRA *et al.*, 2001). O Cerrado é o segundo maior bioma brasileiro, com 2 milhões de Km² e grande diversidade biológica. Apresenta 44% de

flora endêmica (KLINK & MACHADO, 2005), sendo fonte importante de metabólitos primários e secundários de grande potencial antimicrobiano; porém, ainda é pouco explorado como fonte de biomoléculas. Neste contexto, o presente trabalho avalia a atividade antimicrobiana de extratos de plantas nativas do Cerrado, dos gêneros *Guarea* (família Meliaceae) e *Solanum* (família Solanaceae), contra o fungo causador da ramulose do algodoeiro. Futuramente, esses extratos vegetais deverão ser testados quanto à toxicidade a células de mamíferos e especificidade. Seus princípios ativos serão identificados e isolados, a fim de promover o desenvolvimento de defensivos agrícolas economicamente sustentáveis, que não gerem resistência em condições de campo e não causem danos à saúde humana ou ao meio ambiente.

MATERIAL E MÉTODOS

Plantas

Foram usadas as plantas nativas do Cerrado *Guarea kunthiana* A. Juss (nome comum: guarea); *Guarea guidonea* (L) Sleumet (nome comum: guarea) e *Solanum lycocarpum* (nomes comuns: lobeira, fruta de lobo).

Fungo

O isolado de *Colletotrichum gossypii* (South) var. cephalosporioides A. S. Costa foi gentilmente cedido pelo Dr. Nelson Dias Suassuna (Embrapa Algodão, Campina Grande-PB).

Extratos de *Guarea* spp.

Os órgãos vegetais de *Guarea* foram separados e dessecados. A extração dos compostos foi feita a partir da pulverização do material vegetal, maceração e incubação em diferentes solventes (hexano, diclorometano e etanol) durante uma semana. Em seguida, os extratos foram filtrados, concentrados, secados por evaporação rotativa e estocados a -20° C até o uso. Quando da utilização, os extratos secos foram ressuspensos em solvente orgânico Dimetil Sulfóxido (DMSO) 100%. Na tabela 1, identificam-se os extratos por números de 1 a 13, indicando que órgãos vegetais e solventes orgânicos foram usados para preparar os extratos de *Guarea* spp.

Tabela 1: Relação das partes vegetais utilizadas no bioensaio de cada espécie de *Guarea* spp.

Identificação do Extrato	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Solvente de extração
1	<i>Guarea kunthiana</i>	Fruto	Hexano
2	<i>Guarea kunthiana</i>	Fruto	Etanol
3	<i>Guarea kunthiana</i>	Folha	Hexano
4	<i>Guarea kunthiana</i>	Folha	Etanol
5	<i>Guarea kunthiana</i>	Caule (M+C)**	Etanol
NT	<i>Guarea kunthiana</i>	Caule (M+C)	Hexano
6	<i>Guarea guidoea</i>	Raiz (M+C)	Hexano
7	<i>Guarea guidoea</i>	Raiz (M+C)	Etanol
8	<i>Guarea guidoea</i>	Caule (M+C)	Etanol
9	<i>Guarea guidoea</i>	Caule (M+C)	Hexano
10	<i>Guarea guidoea</i>	Folha	Etanol
NT	<i>Guarea guidoea</i>	Folha	Hexano
11	<i>Guarea kunthiana</i>	Raiz (M+C)	Hexano
12	<i>Guarea kunthiana</i>	Raiz (M+C)	Diclorometano
13	<i>Guarea kunthiana</i>	Caule (M+C)	Diclorometano

*NT = Não Testado.

**M + C = Madeira e Casca.

Extrato de *Solanum lycocarpum*

Para a obtenção do extrato aquoso de sementes de *S. lycocarpum* (lobeira), foram triturados 5 gramas de sementes para um volume final de 30mL de água destilada. O extrato foi mantido sob agitação lenta durante 12 horas, a 4° C. Em seguida, o extrato foi centrifugado a 1.2000rpm, durante 40 minutos, a 4° C. O sobrenadante foi coletado e liofilizado. 10mg do material liofilizado foram ressuspensos em 1mL de água destilada e filtrados em filtro *Millipore* de porosidade 0,22µM.

Bioensaios

O efeito dos extratos vegetais sobre o crescimento micelial de *C. gossypii*, var. cephalosporioides, foi avaliado em função da formação de um halo de inibição de crescimento, por meio de antibiogramas em placas de petri contendo meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar). O controle positivo da inibição do crescimento micelial usado foi o antifúngico medicinal *Nistatina*, na concentração de 2000UI. Os controles negativos da inibição do crescimento micelial usados foram DMSO 100% ou água destilada. Todos os bioensaios foram realizados em triplicatas independentes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram feitos bioensaios a fim de avaliar o potencial antifúngico de extratos hexânico, etanólico e diclorometanólico de folha, fruto, raiz e caule de duas espécies de guarea, *Guarea kunthiana* e *Guarea guidonea*, contra o crescimento micelial de *C. gossypii*, var. cephalosporioides. Nem o solvente DMSO 100% nem os extratos contendo 200µg de material vegetal diluído em 17µL de DMSO 100% provocaram inibição do crescimento micelial de *C. gossypii*, var. cephalosporioides (Figura 1A-D). Tais resultados podem refletir: (i) baixa concentração de princípios ativos antifúngicos nos extratos, (ii) impossibilidade de extração dos princípios ativos antifúngicos vegetais por hexano, diclorometanol e etanol, ou (iii) inexistência de princípios ativos antifúngicos em *Guarea kunthiana* e *Guarea guidonea*.

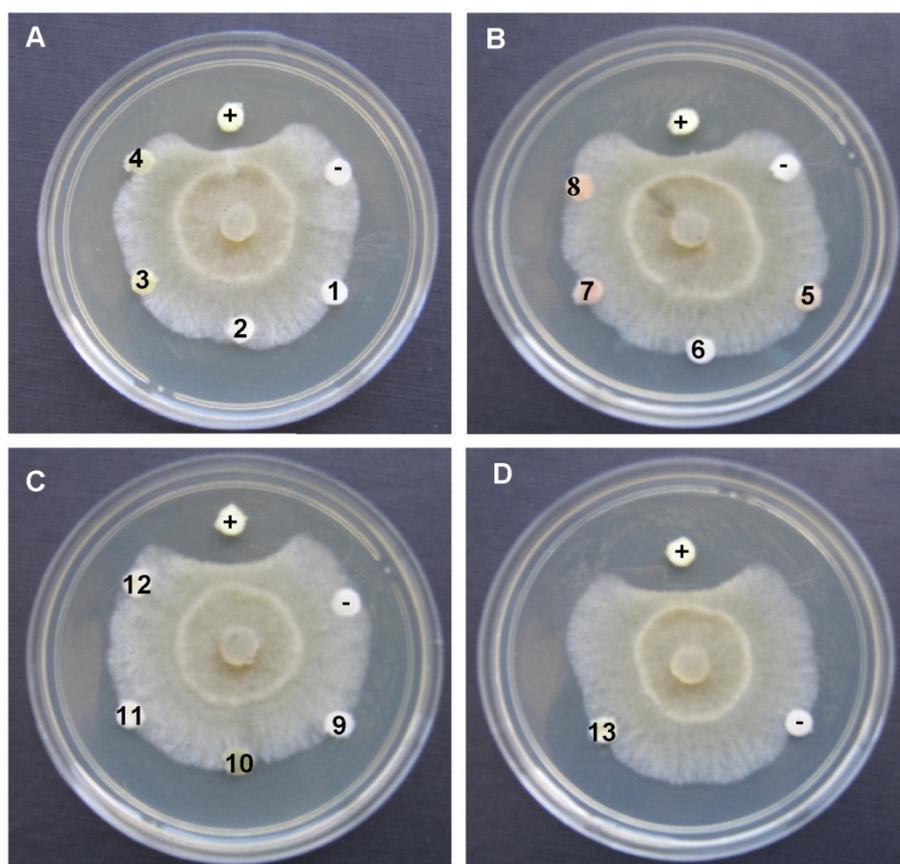


Figura 1: Bioensaio do potencial antifúngico de extratos de folha, fruto, raiz e caule de *Guarea kunthiana* e *Guarea guidonea* contra *C. gossypii*, var. cephalosporioides. 1 a 13. 200µg de material vegetal extraído em hexano, etanol ou diclorometanol, na concentração de 156µg/µL de DMSO 100%, 7 dias após a adição dos extratos. 1 e 2. Extratos hexânico e etanólico de fruto de *G. kunthiana*, respectivamente. 3 e 4. Extratos hexânico e etanólico de folha de *G. kunthiana*, respectivamente. 5. Extrato etanólico de caule de *G. kunthiana*. 6 e 7. Extrato hexânico e etanólico de raiz de *G. guidonea*, respectivamente. 8 e 9. Extrato etanólico e hexânico de caule de *G. guidonea*, respectivamente. 10. Extrato etanólico de folha de *G. guidonea*. 11 e 12. Extrato hexânico e diclorometanólico de raiz de *G. kunthiana*, respectivamente. 13. Extrato diclorometanólico de raiz de *G. kunthiana*. (+). 2000UI do antifúngico medicinal *Nistatina*. (-). DMSO 100%.

Nos bioensaios para avaliar o potencial antifúngico de extrato aquoso de sementes de *S. lycocarpum* contra o crescimento micelial de *C. gossypii*, var. cephalosporioides, observou-se a evidente formação do halo de inibição de crescimento (Figura 2). Este resultado demonstra que é promissora a utilização de princípios ativos hidrossolúveis de sementes de *S. lycocarpum* no controle do fungo causador da ramulose do algodoeiro.

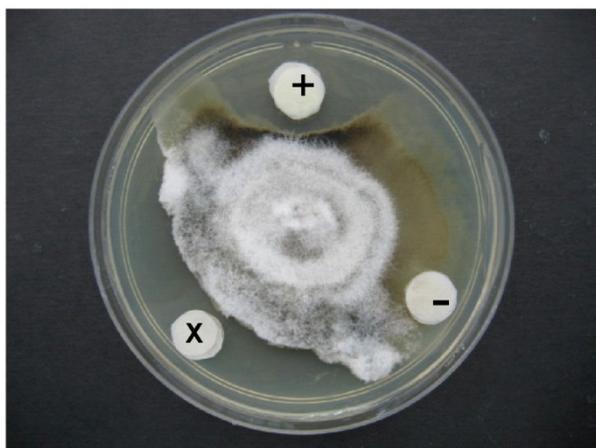


Figura 2: Bioensaio do potencial antifúngico de extrato aquoso de *Solanum lycocarpum* contra *C. gossypii* var. cephalosporioides. **X.** 200 μ g de material vegetal liofilizado extraído com água, na concentração de 10 μ g/ μ L de água destilada, 7 dias após a adição do extrato. **(+).** 2000UI do antifúngico medicinal *Nistatina*. **(-).** Água destilada.

PERSPECTIVAS

Este trabalho identificou princípios antifúngicos hidrossolúveis presentes em sementes de *S. lycocarpum* com atividade para o fungo causador da ramulose do algodoeiro, *C. gossypii*, var. cephalosporioides. As próximas etapas são a identificação e o isolamento desses princípios ativos, assim como a avaliação da toxicidade sobre células de mamíferos, da termoestabilidade e da especificidade. Dessa forma, o presente trabalho abre perspectivas para o desenvolvimento de defensivos agrícolas economicamente e ambientalmente sustentáveis, a serem usados no controle da ramulose do algodoeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALANDRIN, M.F.; KLOCKE, J.A.; WURTELE, E.S.; BOLLINGER W.H. Natural plant chemicals: sources of industrial and medicinal materials. **Science**, v.228, p.1154-1160, 1985.
- GUSMÃO, D.S.; PASCOA, V.; MATHIAS, L, VIEIRA, I.J.C.; BRAZ-FILHO, R.; LEMOS, F.J.A.L. Derris (*Lonchocarpus*) urucu (*Leguminosae*) extract modifies the peitrophic matrix structure o *Aedes aedypti* (*Díptera: Culicidae*). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v.97, p.371-375, 2002.
- IAMAMOTO, M. M. **Doenças foliares do algodoeiro**. Fundação de Estudos e Pesquisas em Agronomia, Medicina Veterinária e Zootecnia - FUNEP, Jaboticabal. 2003.
- IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento sistemático da produção agrícola**. Maio 2006.
- KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. A conservação do Cerrado brasileiro. **Megadiversidade**, v. 1, p. 147-155, 2005.
- VIEIRA, P.C.; MAFEZOLI, J.; BAVATTI, M.W. Inseticidas de Origem Vegetal. In: **Produtos Naturais no Controle de Insetos**. Ed. Ferreira, J.T.B.; Corrêa, A.G.; Vieira, P.C. Editora da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2001.
- ZANDONÁ, C.; NOVAES, T. G.; MEHTA, Y. R. Herança de resistência a *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* em algodoeiro brasileiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.31, p. 76-78, 2006.

EFEITO DAS CITOCININAS NO SUPERBROTAMENTO DO ALGODOEIRO

Carvalho, J. M. F.C.¹; Pimentel, N.W.²; Aires, P.S.R.²; Grossi-de-Sá, M.F.³

¹EMBRAPA – Centro Nacional de Pesquisa do Algodão; ²UEPB – Universidade Estadual da Paraíba/ Estagiárias da Embrapa Algodão; ³EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia
julita@cnpa.embrapa.br

RESUMO

No semi-árido nordestino, o algodoeiro é uma das plantas mais cultivadas, em virtude do alto valor de sua fibra. O aproveitamento da planta do algodão (*Gossypium spp.*) é um dos mais completos, uma vez que são utilizados diversos subprodutos, como o óleo, o línter, a farinha de torta e a casca, todos extraídos da semente ou do caroço do algodão. Uma das metodologias empregadas no processo de cultura de tecidos e micropropagação é o superbrotamento, por meio do qual, a partir de um explante, podem ser obtidas várias plantas geneticamente idênticas à plântula matriz. O objetivo deste trabalho foi induzir a formação de múltiplos brotos no algodão BRS-Verde, determinando o melhor tratamento suplementado com os fitorreguladores (BAP) e (KIN), no explante nó cotiledonar. Para a desinfestação das sementes, foi usada uma solução de hipoclorito de sódio a 1% de cloro ativo. Na indução de múltiplos brotos, foram utilizados sais do meio Murashige e Skoog, suplementados com combinações de BAP e KIN, nas concentrações 0,0; 1,5; 2,5; 3,0; 3,5 mg.L⁻¹, com 10 frascos, cada um contendo três explantes, em um delineamento inteiramente casualizado. As avaliações foram realizadas após 60 dias de cultivo, quando foi determinado o número de brotos por explante. Constatou-se que a combinação de 1,5 mg.L⁻¹ de BAP com 2,5 mg.L⁻¹ de KIN proporcionou a maior capacidade organogênica, alcançando-se no explante nó cotiledonar a melhor média, com 5,19 brotos. Verificou-se, também, que os fitorreguladores BAP e KIN foram eficazes na indução do superbrotamento.

INTRODUÇÃO

O algodoeiro é uma das fibras vegetais cultivadas mais antigas do mundo. É um dos produtos de maior importância econômica do grupo das fibras, pelo volume e valor da produção.

Segundo Amorim Neto e Beltrão (1999), para se ter sucesso na exploração do algodoeiro herbáceo, devem prevalecer condições climáticas que permitam à planta, em seus estágios fenológicos, crescer e se desenvolver, principalmente em relação às condições térmicas e hídricas.

A cultura de tecidos, técnica biotecnológica, refere-se à retirada de células, tecidos, ou mesmo órgãos de uma planta, colocando-os em um meio de cultivo que lhes dê condições de regenerar outras plantas ou estrutura, fundamentando-se no princípio da totipotência celular (SANTOS, 1999). A técnica do cultivo *in vitro* tem como finalidade primária dirigir o crescimento e o desenvolvimento do explante manipulado em seu redor. Este controle se exerce, basicamente, mediante a adição de substâncias de diversas naturezas, principalmente reguladores de crescimento, ao meio de cultivo, como também variando a concentração de determinados nutrientes e, também, por meio do controle das condições de iluminação e temperatura (CARVALHO, 1999).

A micropropagação *in vitro* é a aplicação mais prática da cultura de tecido e a de maior impacto (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). Ela oferece condições para se obter plantas de difícil propagação e de ciclos de vida longos, em um menor espaço de tempo do que o melhoramento convencional.

Segundo Alves (2004), o processo de organogênese é complexo, com atuação de múltiplos fatores externos e internos, envolvendo interação entre fonte de explante, meio de cultura e fatores do ambiente. Depende, também, da ação de reguladores de crescimento exógenos, em particular auxinas e citocininas e da habilidade do tecido em responder a essas mudanças hormonais, durante o período de cultivo (SUGIYAMA, 1999).

O objetivo deste trabalho foi induzir a formação de múltiplos brotos do algodão BRS-Verde, determinando o melhor tratamento suplementado com as citocininas 6-benzilaminopurina (BAP) e cinetina (KIN), no explante nó cotiledonar.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a desinfestação das sementes do algodão BRS-Verde, as sementes foram lavadas e imersas em solução de hipoclorito de sódio a 1% de cloro ativo. Posteriormente, adicionou-se 1mL de Tween 20 para cada 100mL de solução, durante 20 minutos, sob agitação constante. A seguir, foram feitas três lavagens com água deionizada e esterilizada.

Para a obtenção da planta matriz, as sementes foram inoculadas em meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) suplementado com 30g.L⁻¹ de glicose e 0,55% de ágar e o pH ajustado para 5,7 antes da autoclavagem a 120° C. Em seguida os tubos de ensaio foram fechados com papel alumínio e vedados com fitafilme. As culturas foram incubadas no escuro durante 48-72 horas e mantidas na câmara de

crescimento durante 15 dias a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, com fotoperíodo de 16h de luz/8h de escuro e intensidade luminosa de $30 \mu\text{mol.m}^{-2} \text{s}^{-1}$ até a obtenção da planta matriz.

Na câmara de fluxo laminar e com auxílio de instrumentos cirúrgicos esterilizados, os explantes foram separados e excisados e, em seguida, inoculados em frascos contendo sais do meio básico MS com adição de 10mL de cloreto de magnésio (MgCl_2), suplementados com as seguintes combinações das citocininas: 6-benzilaminopurina (BAP) e cinetina (KIN), conforme os tratamentos: T_0 ($0,0 \text{ mg.L}^{-1}$ BAP + $0,0 \text{ mg.L}^{-1}$ KIN); T_1 ($1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ BAP + $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ KIN); T_2 ($1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ BAP + $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ KIN); T_3 ($2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ BAP + $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ KIN); T_4 ($2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ BAP + $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ KIN); T_5 ($2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ BAP + $3,0 \text{ mg.L}^{-1}$ KIN); T_6 ($3,0 \text{ mg.L}^{-1}$ BAP + $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ KIN); T_7 ($3,0 \text{ mg.L}^{-1}$ BAP + $3,5 \text{ mg.L}^{-1}$ KIN); T_8 ($3,5 \text{ mg.L}^{-1}$ BAP + $3,0 \text{ mg.L}^{-1}$ KIN). Todos os meios foram suplementados com sacarose a 3% e phytagel a 0,5% e o pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, a 120°C . Em todos os casos, a incubação foi mantida a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, com fotoperíodo de 16h de luz/8h de escuro e intensidade luminosa de $30 \mu\text{mol.m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Utilizaram-se 10 frascos por tratamento, contendo três explantes cada um.

A cada 20 dias, os explantes foram transferidos em condição de câmara de fluxo laminar para meios frescos, a fim de se evitar problemas de oxidação. A avaliação foi realizada após 60 dias de cultivo, analisando os explantes que superbrotaram e os números de brotos por explante (NBE).

O delineamento usado foi o inteiramente casualizado. Os dados foram analisados mediante o procedimento "General Liner Model (GLM)" do "SAS" (2000), version 8.2, e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das médias alcançadas na indução de número de brotos por explante (NBE) para todas as concentrações utilizadas no explante nó cotiledonar, estão apresentados na Tabela 1, na qual se constata que o T_0 não foi responsivo à indução de multibrotações, Figura 1A, os tratamentos T_1 , T_3 , T_4 , T_5 , T_6 , T_7 e T_8 , não diferiram significadamente entre si, enquanto o T_2 ($1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ BAP + $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ KIN) apresentou efeito diferencial e promissor neste trabalho, alcançando uma proliferação de 5,19 brotos por explante (Figura 1B).

Observa-se que o uso das citocininas BAP e KIN combinadas favorece a obtenção de resultados favoráveis. Tavares *et al.*, (2005) induzindo a multibrotação *in vitro*, a partir de gemas cotiledonares da cultivar de algodão CNPA 98-1034 utilizando-se diferentes concentrações de BAP e KIN, concluiu que as combinações de $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP + $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de KIN favoreceram o maior superbrotamento. Carvalho *et al.*, (2000), utilizando as mesmas citocininas, observou que o KIN não induziu a formação de brotos, apenas o BAP sozinho ou associado ao KIN induziu superbrotamento.

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, percebe-se que a qualidade do explante, o tipo de fitorregulador e as concentrações e combinações utilizadas desempenham importante papel na formação e multiplicação dos brotos, interferindo na variabilidade, integridade e multiplicação do genótipo de algodão utilizado.

Tabela 1. Valores médios da variável número de brotos por explante (NBE), com relação ao explante nó cotiledonar do algodão BRS-Verde, induzido por diferentes concentrações BAP e KIN.

Tratamentos	Número de brotos por explante	
	(NBE) / médias	
T ₀ - (0,0 mg.L ⁻¹ BAP + 0,0 mg.L ⁻¹ KIN)	1,06 f	
T ₁ - (1,5 mg.L ⁻¹ BAP + 1,5 mg.L ⁻¹ KIN)	4,53 ab	
T ₂ - (1,5 mg.L ⁻¹ BAP + 2,5 mg.L ⁻¹ KIN)	5,19 a	
T ₃ - (2,5 mg.L ⁻¹ BAP + 1,5 mg.L ⁻¹ KIN)	3,49 dc	
T ₄ - (2,5 mg.L ⁻¹ BAP + 2,5 mg.L ⁻¹ KIN)	4,16 bc	
T ₅ - (2,5 mg.L ⁻¹ BAP + 3,0 mg.L ⁻¹ KIN)	2,79 de	
T ₆ - (3,0 mg.L ⁻¹ BAP + 2,5 mg.L ⁻¹ KIN)	3,39 dc	
T ₇ - (3,0 mg.L ⁻¹ BAP + 3,5 mg.L ⁻¹ KIN);	2,39 e	
T ₈ - (3,5 mg.L ⁻¹ BAP + 3,0 mg.L ⁻¹ KIN)	2,79 de	
<i>F</i> _{tratamento}	42,64 **	
<i>C</i> _v %	18,05	

Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

**Significativo ($p < 0,01$) pelo teste F

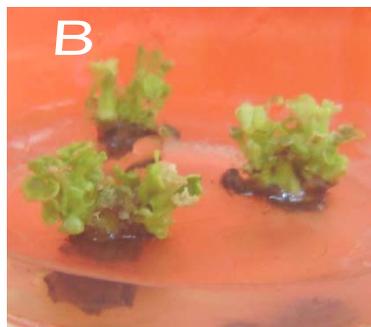


Figura 1. Indução de organogênese do genótipo de algodão BRS-Verde, no explante nó cotiledonar. A) Tratamento T₀ (controle). B) Multibrotação obtida no tratamento T₂ (1,5mg.L⁻¹ BAP + 2,5mg.L⁻¹ KIN).

CONCLUSÕES

- Os tratamentos suplementados com as combinações das citocininas 6-benzilaminopurina (BAP) e cinetina (KIN), induzem a formação de múltiplos brotos no explante nó cotiledonar.
- As concentrações de 1,5mg.L⁻¹ de BAP e 2,5mg.L⁻¹ de KIN proporcionaram melhor capacidade organogênica, com satisfatória proliferação de múltiplos brotos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMORIM NETO, M. de S., BELTRÃO, N.E. de M. Zonamento do algodão herbáceo no Nordeste. In: BELTRÃO, N.E. de M. **O agronegócio do algodão no Brasil**. v. 1, Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 1999. p. 211-229.
- ALVES, E. C. S. de C.; XAVIER, A.; OTONI, W. C. Organogênese de explante foliar de clones de eucalyptus grandis x e. urophylla. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 5, p. 421-430, 2004.
- CARVALHO, J.M.F.C. **Técnicas de micropropagação**. Campina Grande: Embrapa CNPA, 1999. (Embrapa-CNPA. Documento, 64). 39.
- 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. **Revista de Oleoginosas e Fibrosas**. v.4, n.2, p. 61-65, 2000.
- MURASHIGE, T. SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v.5, p 473-497. 1962.
- SAS / STAT User's Guide In: SAS Institute
SAS Online doc: Version 8.2, Cary 2000. CD - ROM
- SANTOS, E.K. dos. Cultura de tecidos: uma ferramenta biotecnológica para o melhoramento vegetal. In: SACCHET, A.M. de ° F. **Genética para que te quero?** Porto Alegre: ed da Universidade – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1999. p. 145
- SUGIYAMA, M. Organogenesis in vitro. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 2, p. 61-64, 1999
- TAVARES, A.C.; M.; PINHEIRO, M.P.N.; JERÔNIMO, J.F.; CARVALHO, J.M.F.; VIDAL, M.S. Indução de multibrotações *in vitro*, a partir de gemas cotiledonares de algodão (*Gossypium hirsutum L.*) da cultivar CNPA 98 - 1034. In: V Congresso Brasileiro de Algodão. Salvador – BA, 2005. **Anais...**Campina Grande – Embrapa, 2005.p.11.

PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DO ALGODÃO VIA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

Carvalho, J.M.F.C.¹; Silva, M.M.de A.²; Medeiros, M.J.L.²; Souza, D.M.¹; Grossi-de-Sá, M.F.³

¹EMBRAPA – Centro Nacional de Pesquisa do Algodão; ²UEPB – Universidade Estadual da Paraíba/ Estagiárias da Embrapa Algodão; ³EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia
julita@cnpa.embrapa.br

RESUMO

A embriogênese somática consiste na formação de embriões somáticos (embrióides), permitindo a obtenção de plantas em grande escala, constituindo-se em uma ferramenta importante nos programas de melhoramento genético de algumas culturas. Objetivando-se induzir a formação de calos embriogênicos em algodão, sementes da cultivar Coker 312 foram germinadas *in vitro* e, sete dias após a germinação, segmentos de hipocótilo foram cultivados durante quatro semanas em placas de *Petri*, para a indução de calos em diferentes meios. Para constatação da rediferenciação dos tecidos e da formação de embrióides, retiraram-se amostras de calos subcultivados na ausência de fitorreguladores e analisados por microscopia eletrônica de varredura. Obtiveram-se calos de coloração amarelo-esverdeado e com aspecto friável no tratamento com ANA e KIN. Calos da mesma cultivar, induzidos em meio com ANA e BAP, não se diferenciaram quando transferidos para o meio MS, apresentando coloração escura.

INTRODUÇÃO

O cultivo de tecidos e células vegetais é uma parte da Biotecnologia que atualmente tem apresentado rápida evolução. De acordo com SACCHET (1999), a cultura de tecidos se refere à retirada de células, tecidos, ou mesmo órgãos de uma planta, colocando-os em um meio de cultivo que lhes dê condições de regenerar outra planta ou estrutura. WILLADINO e CÂMARA (2005), mencionam que esta técnica tem várias aplicações práticas utilizadas amplamente na agricultura, dentre as quais se destacam a clonagem de vegetais, o melhoramento genético e a produção de mudas sadias. Participando da cultura de tecidos, a propagação *in vitro* é a modalidade que mais se tem difundido e encontrado aplicações práticas comprovadas (ERIG e SCHUCH, 2005).

O algodão (*Gossypium hirsutum* L.) é uma das culturas mais significativas e, quando geneticamente modificado, sua importância se torna mais relevante. Contudo, para a obtenção de plantas transformadas, o processo requer o cultivo *in vitro* de protoplasma, células e tecidos da planta que se deseja transformar e que as células e tecidos transformados resultem na regeneração de uma planta transgênica (GYVES, 1994), de grande significância no melhoramento de plantas (BRASILEIRO, 1998).

A embriogênese somática consiste na formação de embrióides a partir de tecidos somáticos. Para que ocorra embriogênese somática, as células diferenciadas devem ser primeiro desdiferenciadas, para só então serem determinadas como células embriogênicas depois da divisão celular (PASQUAL *et al.*, 1997). O genótipo da planta oriunda deste embrião é idêntico à planta matriz, não sendo resultante da combinação de gametas.

Objetivou-se, no presente trabalho, induzir a formação de calos embriogênicos em algodão, de modo a otimizar um protocolo efetivo para a cultura, a partir da embriogênese somática.

MATERIAL E MÉTODOS

Sementes da cultivar Coker 312 foram germinadas *in vitro* e, sete dias após a germinação, segmentos de hipocótilo foram cultivados durante quatro semanas para a indução de calos. O cultivo foi realizado em placas de *Petri* contendo meio básico MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), 30g/L de glucose, 2,5g/L de gelrite, 10,0mg/L de MgCl₂ e 0,3mg/L de tiamina, sendo suplementado com: 1) 2,0mg/L de ANA (Ácido naftalenoacético) + 1,0mg/L de KIN (Cinetina) - IC1; 2) 2,0mg/L de ANA (Ácido naftalenoacético) + 0,5mg/L de BAP (6-benzilaminopurina) - IC2, ambos ajustados para o pH = 5,8.

Após as quatro semanas, os calos foram transferidos para os meios de proliferação, mesmo meio de indução, modificando-se apenas as concentrações dos fitorreguladores: 1) 0,5mg/L de ANA (Ácido naftalenoacético) + 0,1mg/L de KIN (Cinetina) - PC1; 2) 0,5mg/L de ANA (Ácido naftalenoacético) + 0,1mg/L de BAP (6-benzilaminopurina) - PC2, onde foram mantidos durante mais quatro semanas; decorrido este tempo, os calos foram separados do explante inicial, transferidos para o meio contendo sais MS e vitaminas do meio B5 (GAMBORG *et al.*, 1968), na ausência de fitorreguladores, com o dobro de nitrato de potássio (1,9g KNO₃); para cada tratamento foram utilizadas 15 repetições com 12 explantes por placa, com e sem papel de filtro (MN-640M). Em todos os casos os cultivos foram mantidos a 30° C com um fotoperíodo de 16 horas de luz e intensidade luminosa de 30μmol/m²/s⁻¹.

Para constatar a rediferenciação dos tecidos e a formação de embrióides, retiraram-se amostras de calos subcultivados na ausência de fitorreguladores e analisados por microscopia eletrônica de varredura. Para isso, as amostras foram fixadas em tampão cacodilato de sódio 0,2M, contendo glutaraldeído (2,5%) e

paraformaldeído (4%), durante 12 horas. Após este período, foram lavadas três vezes, em tampão cacodilato 0,1M, durante 10 minutos, e pós-fixados em solução de tetróxido de ósmio (1%), em tampão cacodilato 0,2M durante 1 hora. Procederam-se a mais três lavagens em tampão cacodilato 0,1M, durante 10 minutos e posterior desidratação progressiva com etanol 10% a 100% durante 10 minutos cada uma. Na última lavagem, as amostras permaneceram durante 1 hora em etanol 100% antes de se realizar a secagem até o ponto crítico. As amostras foram, então, montadas em suportes metálicos, cobertas com ouro por 180 segundos, utilizando-se metalizador Fine Coat – íon Sputter/JFC-1100 – e observadas ao microscópio de varredura (JEOL – JSM/5600LV/Scanning Electron Microscope).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidos calos de coloração amarelo-esverdeado e com aspecto friável no tratamento com ANA e KIN, a partir de segmentos de hipocótilo da cultivar Coker 312.

A indução dos calos somáticos foi ainda testada por subcultivos, diretamente sobre o meio e em papel de filtro, observando-se que a proliferação maior ocorreu no tratamento em que os calos foram subcultivados diretamente ao meio (Figura 1). A obtenção de embrióides da cultivar Coker 312 foi conseguida em meio MS na ausência de fitorreguladores, observados a olho nu (Figura 2).

No protocolo com ANA e BAP não ocorreu formação de embrióides e os calos escureceram nos subcultivos sucessivos.

De acordo com TULI e KUMAR (2004), os maiores problemas para o êxito das aplicações da biotecnologia em algodão estão na dependência do genótipo e na baixa frequência de embriogênese somática, resultando na dificuldade da regeneração de tecidos transformados, porém Leelavathi *et al.* (2004) conseguiram a regeneração de um elevado número de plantas de algodão transgênico, cerca de 83%, a partir de calos embriogênicos, após a transformação por *Agrobacterium*.

É possível que a divergência dos resultados, quanto à eficiência da embriogênese somática em algodão, deva estar associada a genes que codificam proteínas envolvidas em respostas inicial e fisiológica da mesma, e nos subseqüentes estádios de desenvolvimento dos embriões somáticos (ZENG *et al.*, 2006). A partir da análise dos tecidos processados para microscopia eletrônica de varredura (Figura 3), nas amostras dos calos provenientes do meio IC1, foi possível constatar a rediferenciação dos tecidos, confirmando a embriogênese somática.



Fig.1: Calos embriogênicos em meio de rediferenciação

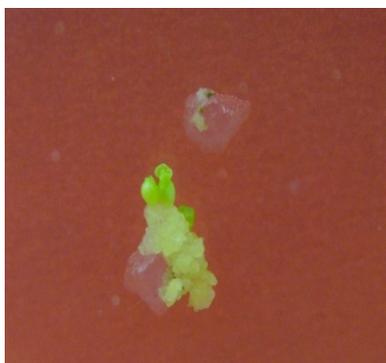


Fig.2: Embrióides da cultivar Coker 312



Fig.3: Micrografia de varredura dos calos embriogênicos

CONCLUSÕES

Calos da cultivar Coker 312 induzidos em meio IC1 (ANA e KIN), quando subcultivados em meio básico MS, sem de adição de fitorreguladores, desenvolveram calos embriogênicos. Os calos induzidos em meio IC2 (ANA e BAP) não se diferenciaram quando transferidos para o meio MS, observando-se coloração escura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.R. de C. (eds). **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa SPI/Embrapa Cenargem, 309p, 1998.
- ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W. **Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural**. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/cr/v35n4/a39v35n4.pdf>. Acesso em: 12/10/2005.
- GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Expression Cell Research**, n.50, p.151-158. 1968.

GYVES, E.M. **Agrobiotecnologia**. Iberoamérica. México, p. 78, 1994.

LEELAVATHI, S.; SUNNICHAN, V.G.; KUMRIA, R.; VIJAYKANTH, G.P.; BHATNAGAR, R.K.; 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 Reporter*.v.7, p.465-70, 2004.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v.15 p. 473-497, 1962.

PASQUAL, M.; HOFFMANN, A.; RAMOS, J.D. **Cultura de tecidos; tecnologia e aplicações**. Lavras: Ed. Brasil, 1999.

SACCHET, A.M. de O.F. **Genética para que te quero?** Porto Alegre: Ed. da Universidade – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1999. p.144-145.

TULI, R.; KUMAR, M. Plant regeneration in cotton: a short-term inositol starvation promotes developmental synchrony in somatic embryogenesis. *In Vitro Cellular and Development Biology – Plant*. v.40, n.3, p.294-298, 2004.

WILLADINO, L.; CAMARA, T. **Cultura de tecidos vegetais**. Disponível em: <http://www.ufrpe.br/quimica/culttec.htm>. Acesso em: 16 out. 2005.

ZENG, F.; ZHANG, X.; ZHU, L. TU, L.; GUO, X.; NIE, Y. Isolation and characterization of genes associated to cotton somatic embryogenesis by suppression subtractive hybridization and macroarray. **Plant Molecular Biology**. v. 60, p.167-183, 2006.

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DO ALGODOEIRO (*Gossypium hirsutum*)

Evangelista, I.B.R.¹; Bodens, F.W.P.^{1,2}; Muchagata, I. S.¹; Paula, A. W. M.^{1,2}; Oliveira Neto, O.B.^{1,4}; Teixeira, J. B.¹; Leelavathi, S.³; Grossi-de-Sá, M.F.^{1,2}

¹EMBRAPA – Recursos Genéticos e Biotecnologia; ²UCB – Universidade Católica de Brasília; ³ICGEB – International Center for Genetic Engineering and Biotechnology, ⁴Centro Universitário Unieuro.
isabela@cenargen.embrapa.br

RESUMO

A rentabilidade do produtor de algodão no Brasil poderia ser superior se não fossem os gastos elevados para o controle de insetos-praga, com destaque para o bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis*). A pesquisa biotecnológica oferece soluções para a contenção de pragas, sendo as plantas geneticamente modificadas (GM) uma das alternativas. Para introduzir na planta de algodão características de resistência às pragas, por meio da engenharia genética, a estratégia mais utilizada é a transformação genética, via *Agrobacterium*, associada à regeneração via embriogênese somática. O presente trabalho teve por objetivo a obtenção de material embriogênico de algodão para possibilitar a introdução dos genes capazes de expressar proteínas defensivas. O trabalho foi baseado na literatura existente e resultou na produção de calos embriogênicos, no desenvolvimento de embriões somáticos, e na regeneração de plantas completas de algodão.

INTRODUÇÃO

No Brasil, são feitos grandes investimentos em tecnologia agrícola e pesquisas para produção de fibra de algodão. O resultado disso, e de uma eficiente comercialização, coloca o País como o quarto exportador mundial, atrás apenas dos Estados Unidos, do Uzbequistão e da Austrália. Com as vendas da safra de 2007, é estimado que o cotonicultor brasileiro ganhe 13% de lucro, se a cotação do dólar for de R\$ 2,20. Porém, com a atual depreciação da moeda norte-americana, esse lucro tende a diminuir (REETZ *et al.* 2006).

Uma das maneiras de amenizar os efeitos das oscilações do câmbio sobre o lucro dos produtores é reduzir os custos de produção. Para reduzir tais custos, no mundo já são cultivados 10 milhões de hectares de algodão GM. No Brasil, poderiam ser plantados 700 mil hectares com sementes transgênicas, que corresponde mais ou menos à área dos produtores que fazem um uso mais intensivo de tecnologia. Mas somente a partir da safra de 2006/2007 a tecnologia Bollgard, da Monsanto, poderia ser adotada, após sua aprovação pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), em março de 2005. Com o plantio do Bollgard, a previsão é de três aplicações de produtos químicos na lavoura, gerando uma redução de 5% nos custos, enquanto a produtividade aumenta também na faixa de 5%. Entretanto, os custos poderiam ser reduzidos de 25% a 30%, caso o Brasil não estivesse 10 anos atrasado em relação a outros países que já adotam tecnologias mais avançadas em termos de transgenia (REETZ *et al.* 2006).

Para superar essa defasagem, a Embrapa está investindo na pesquisa para obtenção da primeira variedade mundial de algodão transgênico resistente ao bicudo-do-algodoeiro, uma das mais agressivas pragas da cotonicultura, cuja ação afeta a produtividade e aumenta os custos de produção (REETZ *et al.* 2006). A respeito das formas de obtenção de variedades de algodão GM, verifica-se que em países que são grandes produtores, como EUA, China, Austrália e Índia, este algodão é obtido com maior frequência por meio do método de transformação via *Agrobacterium*, associado à embriogênese somática. Na China, o método de transformação via tubo polínico também é muito utilizado.

A embriogênese somática é uma ferramenta biotecnológica preferencial porque permite uma propagação vegetativa em larga escala e a regeneração de plantas completas a partir de células isoladas modificadas geneticamente. Partes dos hipocótilos e cotilédones de plântulas de algodão são induzidas a produzir calos embriogênicos, que por sua vez produzem embriões somáticos semelhantes aos embriões zigóticos. Para se ter uma noção da quantidade de artigos sobre esse tema, dos 58 artigos publicados entre os anos de 1983 e 2006 sobre regeneração do algodão, 51 fazem estudos sobre o referido método. Os demais artigos se referem à organogênese.

Quando se compara a transformação via *Agrobacterium* com a transformação por meio de biobalística, são encontrados na literatura 19 artigos para o primeiro contra apenas três para o segundo, no período de 1987 a 2006.

A embriogênese somática é o método mais usado para regenerar plantas GM de algodão, apesar de apresentar alguns obstáculos, tais como: a dependência do genótipo, que pode variar até mesmo entre sementes da mesma variedade (WILKINS *et al.*, 2004; SAKHANOKHO *et al.*, 2004 e 2005); o tempo necessário para estabelecer um meio de cultura adequado ao genótipo; o prolongado período de cultura, que pode resultar em variação somaclonal (WILKINS *et al.*, 2000); a alta frequência de embriões anormais de vários tipos, alguns com ausência de raiz ou cotilédones (KUMRIA *et al.*, 2003; TOHIDFAR *et al.*,

2005); a falta de uniformidade devido à presença simultânea de calos e embriões em diferentes estágios de desenvolvimento (WILKINS *et al.*, 2000); a baixa frequência na conversão de embriões em plantas (KUMRIA *et al.*, 2003); as dificuldades no transplante para o solo (SAKHANOKHO *et al.*, 2004); e a redução da embriogênese atribuída à natureza dos genes introduzidos (WILKINS *et al.*, 2000; JIN *et al.*, 2006).

Regenerar plantas férteis derivadas de células únicas é a questão mais difícil de ser superada. Porém, tanto a transformação via *Agrobacterium*, quanto a transformação via biobalística, têm sido usadas com vários níveis de sucesso com a cultura de células e meristemas (WILKINS *et al.*, 2000).

O presente trabalho teve por objetivo regenerar plantas de algodão por meio da embriogênese somática, a fim de estabelecer a técnica em nosso laboratório. Também objetivou a multiplicação de calos embriogênicos para posteriormente serem transformados via *Agrobacterium* com genes tóxicos aos insetos-praga do algodoeiro.

MATERIAL E MÉTODOS

Sementes deslintadas de algodão (*Gossypium hirsutum*) das variedades Coker 310, Coker 312 e cultivar BRS Cedro foram esterilizadas em etanol 70% durante 2 minutos, e, em seguida, com hipoclorito de sódio 4% durante 20 minutos. Após a desinfestação superficial, as sementes foram rinsadas em água Milli-Q estéril e colocadas para germinar em MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) com 10g/L de sacarose e 7,6g/L de ágar. Os lotes que apresentaram difícil germinação *in vitro* foram deixados em água Milli-Q estéril durante 24 horas e tiveram seus tegumentos removidos.

Explantos de 4 a 6mm foram cortados de hipocótilos de plântulas germinadas por 3 dias até 2 semanas e colocados em meio para indução de calos MS contendo 0,1mg/L de 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), 0,5mg/L de cinetina, 30g/L de maltose, e 2g/L de phytigel ou 7,6g/L de ágar. O período de indução foi de 5 a 10 semanas, com realização de subcultivos dos explantes inteiros durante esse intervalo. Após o período de indução, os calos foram subcultivados em meio MS contendo 30g/L de maltose, e 2g/L de phytigel ou 7,6g/L de ágar, durante 4 semanas. Para a formação dos calos embriogênicos, os calos foram transferidos para meio MS acrescido de 1,9g/L de KNO₃, 30g/L de maltose, 2g/L de phytigel ou 7,6g/L de ágar.

No meio suplementado com KNO₃ foram observados embriões globulares em menos de um mês de cultivo. Desde então, a cultura embriogênica foi multiplicada em meio MS com vitaminas MS ou B5 (GAMBORG *et al.*, 1968), 10g/L ou 30g/L de maltose, 2g/L de phytigel ou 7,6g/L de ágar. A multiplicação dos calos embriogênicos continuou sendo realizada juntamente com o surgimento e maturação dos embriões.

Parte dos calos embriogênicos também foram subcultivados em um meio composto por MS com 20g/L de sacarose, 1,32mg/L de ácido abscísico (ABA), e 2g/L de phytigel.

Com o surgimento dos embriões, o vedamento de algumas placas passou a ser realizado por uma fita cirúrgica porosa (Micropore), enquanto foi mantido o vedamento por filme de PVC (*Wrap*) em outras placas. Além disso, muitos embriões foram colocados sobre papel de filtro Whatman (catálogo: 1004070).

A germinação dos embriões ocorreu em MS com 10g/L de sacarose e 2g/L de phytigel. Alguns embriões anormais foram colocados em MS suplementado com 0,75g/L de MgCl₂, 5g/L de sacarose, e 3,2g/L de phytigel.

As plântulas pequenas apresentando raízes e folhas foram transferidas para magentas contendo MS ½ acrescido de 10g/L de glicose, 0,1mg/L de ácido 3-indolacético (AIA), e 3,2g/L de phytigel, para regeneração das plantas.

Os meios de cultura tiveram o pH ajustado para 5.8 e foram autoclavados durante 15 minutos.

As condições ambientais para todos os passos foram 16/8 h (dia/noite) de fotoperíodo, intensidade de luz de 60μE m⁻²s⁻¹ e temperatura em torno de 28° C.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O protocolo utilizado foi baseado na publicação de KUMRIA *et al.* (2003) e teve reprodutibilidade para as nossas condições laboratoriais. Entretanto, de acordo com a genótipo-dependência do algodão para a embriogênese, alguns explantes de Coker não geraram embriões. WILKINS *et al.* (2004) e SAKHANOKHO *et al.* (2004, 2005) afirmam que um alto potencial de regeneração é atingido pela cultivar Coker, caso a sua fonte de sementes seja especificamente selecionada para essa característica. Quanto a embriogênese somática para a cultivar BRS Cedro, também não foi obtida.

Apesar da genótipo-dependência do algodão para a embriogênese, a literatura tem apresentado resultados em vários genótipos de *Gossypium spp.*, como nos trabalhos de SAKHANOKHO *et al.* (2004, 2005) e JIN *et al.* (2006). Portanto, é possível que em trabalhos futuros, diferentes composições de meio de cultura

possam otimizar a embriogênese somática do algodão para cultivares brasileiras importantes, como a BRS Cedro ou outras.

Embriões globulares (Figura 1A) e embriões no último estágio de desenvolvimento, que é o estágio cotiledonar (Figura 1B), foram encontrados junto aos calos embriogênicos e embriões globulares (Figura 1C), da mesma forma que na literatura consultada. Essa presença simultânea de calos embriogênicos e embriões em diferentes estágios de desenvolvimento é considerada um obstáculo da embriogênese somática por dificultar o manejo, fazendo com que seja necessário subcultivar o material advindo de uma mesma placa de Petri em diferentes meios de cultura e de acordo, também, com os períodos adequados devido a falta de sincronismo do material. Visando otimizar o protocolo, foi formulado um meio que amenizasse esse problema. Para isso, foi adicionado ácido abscísico e feita a substituição da maltose pela sacarose. O resultado aparente foi de uma maior uniformidade dos calos embriogênicos (Figura 1D). Esse resultado deve ser repetido para maiores comprovações, incluindo também o cultivo de embriões no mesmo meio.

No meio de cultura MS com vitaminas B5 e 30g/L de maltose, vedado por Micropore, não houve uniformidade da embriogênese, como já era esperado, mas ocorreu uma boa multiplicação de calos embriogênicos para serem usados na transformação via *Agrobacterium*, assim como boa maturação dos embriões (Figura 1A). Em nossos experimentos, também foi observado que o uso da fita micropore, ou do papel de filtro (Figura 3A), para permitir um estresse metabólico contribuiu para a maturação dos embriões como previamente descrito por Kumria *et al.* (2003).

Além da falta de uniformidade, um outro obstáculo da embriogênese do algodão é a alta taxa de embriões anormais, como mostram as Figuras 2A e 2B. Porém, em nossos experimentos nos meios de germinação – com destaque para o meio contendo $MgCl_2$ – embriões anormais apresentaram embriogênese secundária, gerando nova fonte de material para transformação (Figura 2C). **Ou senão**, ainda nos meios de germinação, alguns embriões anormais foram naturalmente convertidos em plantas como a da Figura 2D. O embrião da planta ilustrada na figura 2D permaneceu três meses no meio de germinação antes de ser transferido para regeneração em magenta contendo o meio MS $\frac{1}{2}$ e AIA. Para embriões normais, o tempo de germinação é bem menor; alguns germinam em uma semana.

Cinco placas de Petri que estavam em fase de repicagem de calos embriogênicos foram subcultivadas e o número de placas gerado a partir desse material inicial foi contado após 6 meses (Tabela 1). Os números da tabela ilustram a presença simultânea de embriões e calos em um material proveniente de uma mesma fonte. Ou seja, ao mesmo tempo em que eram colocados materiais em meios de cultura para o subcultivo de multiplicação e maturação, eram colocados materiais em meios de germinação. A figura 3B ilustra a aparência de uma placa contendo tanto calos destinados a transformação quanto embriões para serem transferidos para meio de germinação. A figura 3C ilustra um embrião em meio de germinação. A média do número de embriões em cada placa (Tabela 2) foi muito variada de acordo também com a manipulação e não somente quanto ao potencial do material. Isto é, calos e embriões colocados muito próximos estimularam a multiplicação, enquanto que uma disposição mais espaçada estimulou a maturação e a regeneração.

As primeiras plantas obtidas foram regeneradas após 10 meses contados a partir do dia de desinfestação das sementes. Espera-se que essas plantas sejam fontes de sementes com potencial embriogênico. Se assim for, o presente trabalho contribuiu para viabilizar a embriogênese somática da variedade Coker em nosso laboratório.

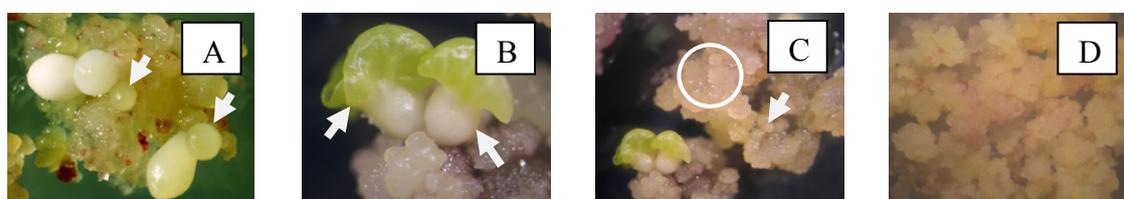


Figura 1: A. Embriões globulares (setas). B. Embriões cotiledonares. C. Embriões cotiledonares juntamente com calos embriogênicos (círculo) e embriões globulares (seta). D. Calos embriogênicos em tratamento com ABA e sacarose.

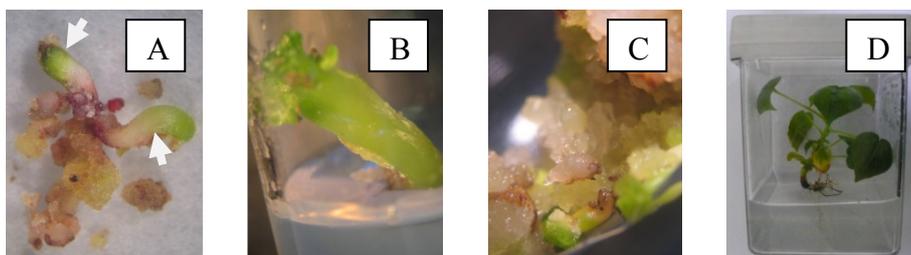


Figura 2: **A.** Embriões anormais. **B.** Embrião anormal. **C.** Embriogênese secundária a partir de embrião anormal. **D.** Planta regenerada a partir de embrião anormal.



Figura 3: **A.** Embriões normais em diversos estágios sobre papel de filtro. **B.** Placa de Petri contendo calos embriogênicos para transformação, e também embriões em diversos estágios. **C.** Embrião normal germinando.

Tabela 1: Quantia de placas de Petri obtida após 6 meses de subcultivos a partir de 5 placas de Petri iniciais (A, B, C, D, E), e média do número de embriões/placa contendo calos e embriões.

Placa de Petri inicial	Nº de placas contendo calos embriogênicos e embriões	Nº de placas contendo embriões em germinação	Média do nº de embriões por placa contendo calos embriogênicos e embriões
A	15	1	328
B	11	16	168
C	10	4	152
D	45	11	24
E	20	13	-

PERSPECTIVAS

Espera-se multiplicar o material embriogênico já obtido, bem como reiniciar todo o processo a partir de novos lotes de sementes, para que seja aplicada a transformação via *Agrobacterium*, inserindo genes que codificam para toxinas *Bt* com especificidade e atividade contra as pragas do algodoeiro, com enfoque no bicudo-do-algodoeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- GAMBORG, O. L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension culture of soybean roots cells. **Experimental Cell Research**, v. 50, p.150-158, 1968.
- JIN, S.; ZHANG, X.; NIE, Y.; GUO, X.; LIANG, S.; ZHU, H. Identification of a novel elite genotype for *in vitro* culture and genetic transformation of cotton. **Biologia Plantarum**, v. 50, n. 4, p. 519-524, 2006.
- KUMRIA, R.; SUNNICHAN, V.G.; DAS, D.K.; GUPTA, S.K.; REDDY, V.S.; BHATNAGAR, R.k.; 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.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiology Plantarum** v. 15, p. 474-497, 1962.
- REETZ, E.; VENCATO, Â.; CORRÊA, S.; RIGON, L.; ROSA, G.R.; RUDOLFO, R.B. Anuário brasileiro do algodão 2006. **Editora Gazeta**, 144p, 2006.
- SAKHANOKHO, H.F.; OZIAS-AKINS, P.; MAY, O.L.; CHEE, P.W. Induction of Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration in Select Georgia and Pee Dee cotton Lines. **Crop Science**, v. 44, p. 2199-2205, 2004.
- SAKHANOKHO, H.F.; OZIAS-AKINS, P.; MAY, O.L.; CHEE, P.W. Putrescine enhances somatic embryogenesis and plant regeneration in upland cotton. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 81, p. 91-95, 2005.

TOHIDFAR, M.; MOHAMMADI, M.; GHAREYAZIE, B. *Agrobacterium*-mediated transformation of cotton (*Gossypium hirsutum*) using a heterologous bean chitinase gene. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.83, p. 83-96, 2005.

WILKINS, T.A.; RAJASEKARAN, K.; ANDERSON, D.M. Cotton Biotechnology. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 19, n.6, p. 511-550, 2000.

WILKINS, T.A.; MISHRA, R.; TROLINDER, N.L. *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of cotton. **Food, Agriculture & Environment**, v. 2, n. 1, p. 179-187, 2004.

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE NOVOS PROMOTORES ISOLADOS DE SOJA E ALGODÃO

Guimarães, L.M.^{1,2}; Pontes, N.^{1,2}; Viana, A.A.B.¹, Batista, J.A.N.¹; Fragoso, R.R.³; Grossi de Sá, M.F.¹
¹EMBRAPA – Recursos Genéticos e Biotecnologia; ²UnB – Universidade de Brasília; ³EMBRAPA Cerrados.
lucianemg@yahoo.com.br

RESUMO

O controle de insetos-praga na agricultura é feito, principalmente, por meio da aplicação de agroquímicos sintéticos. Entretanto, esses pesticidas reduzem em apenas 7% os prejuízos causados por insetos. Dessa forma, a produção de plantas geneticamente modificadas (GM) expressando proteínas que confirmam resistências a insetos-praga vem sendo aplicada com bastante sucesso. Porém, para a geração de plantas GM, são necessários o controle e o direcionamento da expressão das proteínas entomotóxicas para os locais onde os insetos-praga geram danos. Com o objetivo de se obter seqüências capazes de direcionar a expressão de proteínas no sítio de alimentação de fitonematóides sedentários e/ou em botões florais de algodoeiro, foram isolados por Tail-PCR as regiões promotoras do gene da proteína de conjugação a ubiquitina da família *Leubc4* de soja e algodão. Essas seqüências foram subclonadas adjacentes ao gene *gus*, cuja capacidade de promover a expressão em diferentes partes da planta de *Arabidopsis thaliana* também foi avaliada.

INTRODUÇÃO

O algodão (*Gossypium* sp) é uma das mais importantes culturas mundiais, considerada a mais importante das fibras têxteis. O Brasil é um dos maiores produtores de algodão do mundo. No entanto, o seu nível de produtividade é altamente influenciado por problemas na agricultura, como o ataque de insetos-praga, cujo controle gera custos de cerca de 25% do valor total do custo de produção.

Dentre as pragas que atacam a cultura, o bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis*) se apresenta como o inseto causador de maiores prejuízos. Devido ao seu hábito alimentar endofítico em botões florais, seu controle pelo uso de inseticidas se torna ineficiente, onerando significativamente o custo de produção, além dos danos causados à saúde do agricultor e ao meio ambiente.

Dessa forma, a produção de cultivares geneticamente modificadas (GM) expressando proteínas entomotóxicas que confirmam resistência a diversos insetos-praga são amplamente adotadas, alcançando em 2005/06 uma área plantada global de GM de quase 87,2 milhão hectares (JAMES, 2006).

No entanto, para a obtenção de plantas transgênicas com níveis adequados de proteínas que confirmam resistência à 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 usá-los, onerando, assim, a produção.

Com o objetivo de buscar e caracterizar funcionalmente seqüências promotoras para a expressão no botão floral do algodoeiro, foram amplificados por "Tail-PCR" os promotores de soja (Figura 1) e algodão (Figura 2) que regulam os 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 & WHITTIER, 1995). Este gene foi selecionado em função de ter sido previamente caracterizado como sendo expresso em botões florais de algodão e nos sítio de alimentação de nematóides fitoparasitas sedentários (BIRD, 1996) (análise de ESTs de algodão depositados nos bancos de dados).

A estratégia adotada consistiu na transformação de plantas de *Arabidopsis thaliana*, com construções gênicas contendo os promotores, associado ao gene repórter *gus*, e na análise e quantificação da expressão temporal e espacial do gene repórter nas plantas transformadas. A partir destas análises, foi possível avaliar o potencial destes promotores a fim de direcionar a expressão de transgenes em plantas de algodão visando o desenvolvimento de plantas resistentes ao bicudo do algodoeiro. Recentemente, plantas de *Arabidopsis* transformadas com as construções gênicas contendo os promotores, associados ao gene repórter *Gus*, estão sendo analisadas com a finalidade de verificar o padrão de expressão do gene repórter nos sítios de alimentação de nematóides fitoparasitas visando também o desenvolvimento de plantas resistentes a nematóides sedentários.

MATERIAL E MÉTODOS

Os promotores do gene da proteína de conjugação a ubiquitina da família *Leubc4* de soja e algodão foram isolados conforme descrito nas patentes GROSSI DE SÁ *et al.*, 2006a,b, 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

com o segmento amplificado de 1000 pb, incluindo a região 5' não traduzida e a extremidade 5' da região codificadora do gene (uceS8.3 para soja e uceA1.7 para algodão), assim com uma região do promotor (uceSpro1 para soja e uceApro2 para algodão) de aproximadamente 800 pares de base. A subclonagem da região promotora foi feita por PCR, por meio 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.

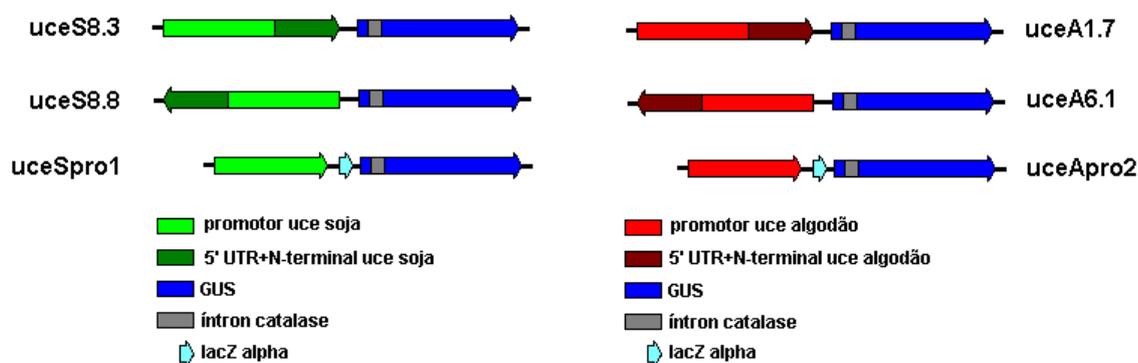


Figura 1. Representação esquemática das construções com os promotores de soja e algodão do gene da proteína de conjugação à ubiquitina da família *Leubc4*. Os elementos da figura não estão em escala. uceS8.3 – gene *gus* sob controle do promotor do gene da proteína de conjugação à ubiquitina de soja 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 utilizadas para a transformação de plantas de *Arabidopsis thaliana* Columbia pela técnica de infiltração de botões florais (CLOUGH & BENT, 1998). Após quatro semanas, as sementes foram coletadas, desinfestadas e semeadas em meio de cultura MS contendo higromicina na concentração de 40µg/ml, visando a seleção de transformantes (Figura 2a).

As plântulas germinadas e enraizadas foram transferidas para casa de vegetação (Figura 2b).

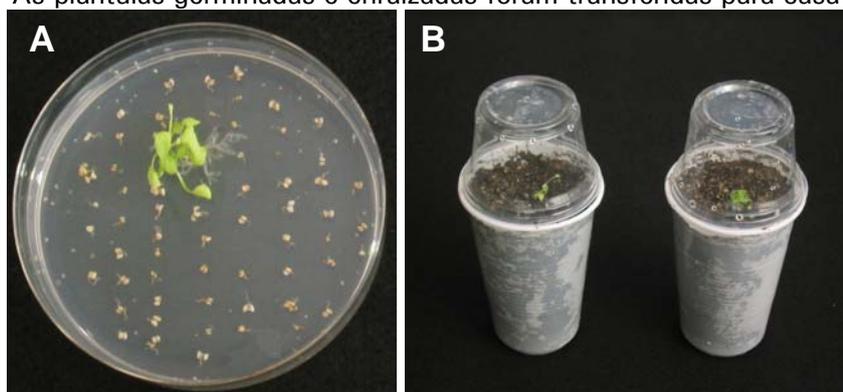


Figura 2. (A) Seleção de transformantes em higromicina 20 µg/mL e (B) aclimação das plântulas selecionadas em casa de vegetação.

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*.

Depois da análise qualitativa quanto à localização da expressão do gene *gus* por ensaio em X-gluc. Foram realizados ensaios fluorimétrico de atividade enzimática do GUS, a fim de avaliar quantitativamente os níveis de expressão do gene *gus*.

Sementes da geração F2 de *A. thaliana* transformadas com os promotores 35Sd, UceA1.7, e UceS8.3 foram submetidas ao agente de seleção (Higromicina 40µg/ml) e ao ensaio de X-gluc, e infectadas com o nematóide *Meloidogyne incognita*, para posterior análise da expressão dos promotores nas plantas transformadas, após a sua infecção (Figura 3)



Figura 3. Inóculo de 5.000 ovos de nematóide *M. incognita* em cada planta de *A. thaliana* transformada, que serão analisadas após 40 dias de infecção.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A eficiência obtida na transformação das plantas de *Arabidopsis* foi de 0,1%. Esta eficiência de transformação é considerada, 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 e UceSpro1 (ver construção na Figura 1), bem como as de algodão, UceA1.7 e UceApro2 promoveram atividade enzimática de β -glucuronidase, enquanto as construções antisense, UceS 8.8 e UceA6.1 foram inativas, conforme o esperado (Figura 4 e 5), quando comparado ao controle positivo contendo o promotor CaMV35S (Cauliflower Mosaic Vírus 35S promoter) duplicado com o *enhancer* do AMV (Alfafa Mosaic Vírus) (CaMV35SdAMV) (Figura 4A e 5A).

A construção senso do promotor de soja uceS8.3 (ver construções na Figura 1), bem como as de algodão, uceA1.7 e uceApro2 promoveram atividade enzimática de β -glucuronidase, enquanto as construções anti-sense, uceS8.8 e uceA6.1 foram inativas, conforme o esperado (Figura 4 e 5), quando comparado ao controle positivo contendo o promotor CaMV35S (Cauliflower Mosaic Vírus 35S promoter) duplicado com o *enhancer* do AMV (Alfafa Mosaic Vírus) (CaMV35SdAMV) (Figura 4A e 5A).

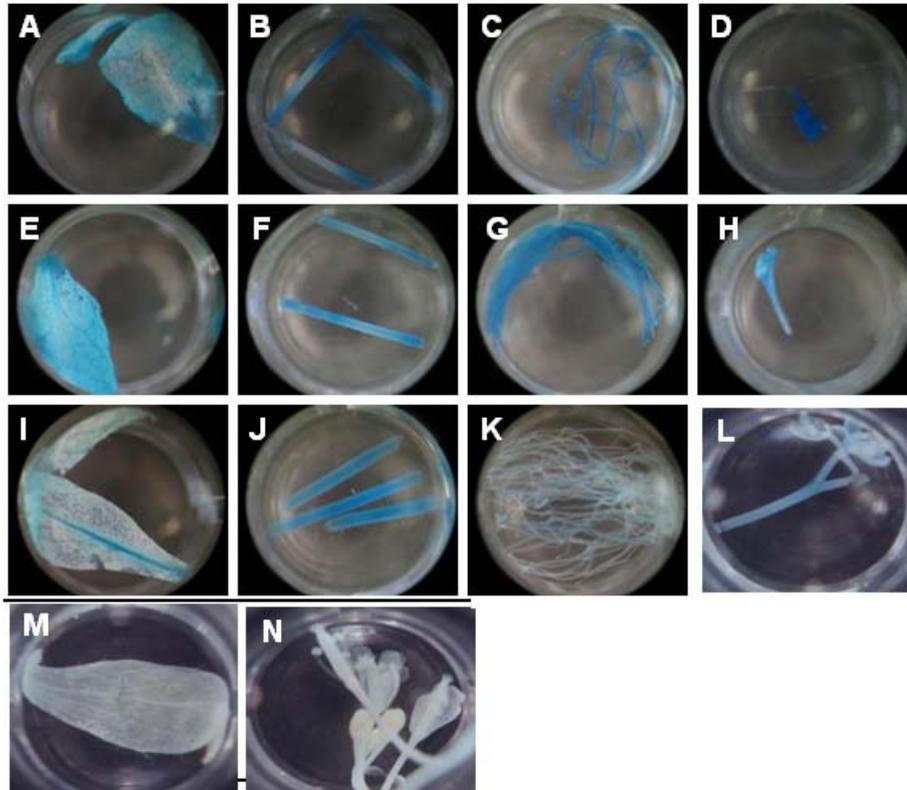


Figura 4 Amostras de folhas, caules, raízes e botões florais de *A. thaliana* transformadas com o gene *gus* sob controle das seqüências das construções (A-D) 35SdAMV; (E-H) *uceA1.7* e (I-L) *uceApro2*; (M-N) *UceA 6.1*

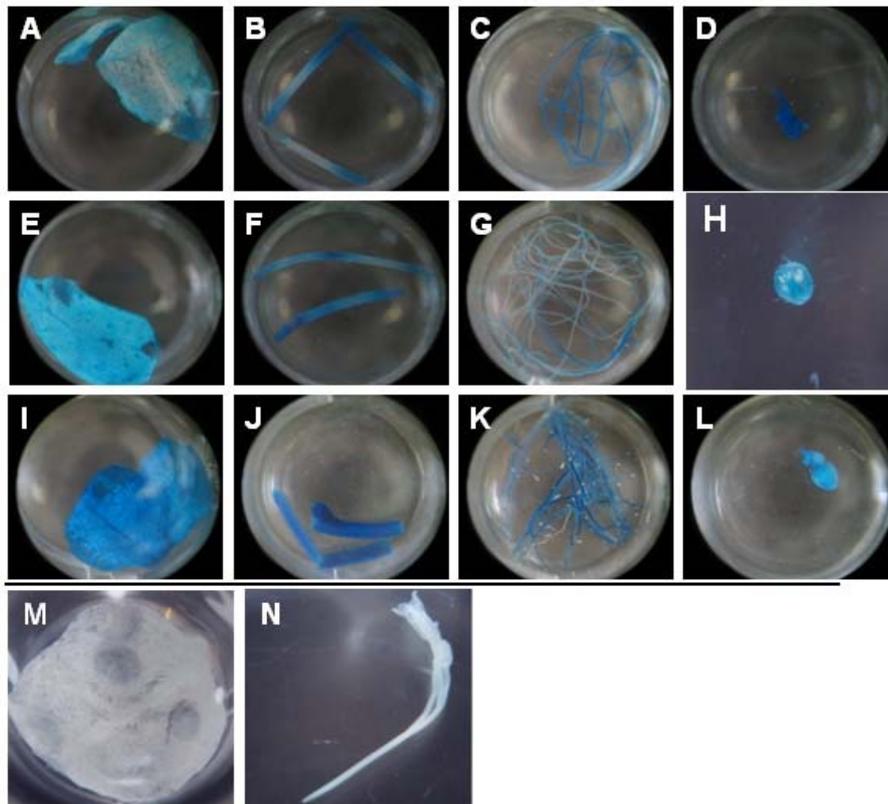


Figura 5. Amostras de folhas, caules, raízes e botões florais, respectivamente, de *A. thaliana* transformadas com o gene GUS sob controle das seqüências das construções (A-D) CaMV35SdAMV (E-H) uceS8.3 e (I-L) uceSpro1; (M-N) UceS8.8.

Após a análise do ensaio fluorimétrico de atividade enzimática da β -glucuronidase, nos diferentes tecidos da *A. thaliana*, como folha, caule e botão floral, observou-se que as seqüências dos promotores isolados pelo grupo contendo a região 5' não traduzida e a extremidade 5' da região codificadora do gene (UceS8.3 para soja e UceA 1.7 para o algodão), apresentou maior expressão, quando comparado ao controle positivo contendo o promotor CaMV35S duplicado com enhancer do AMV (Gráfico 1). Porém, as seqüências contendo somente a região do promotor (UceSpro1 para soja e UceApro2 para o algodão) apresentaram um nível de expressão menor, observando assim a relação da presença da região 5' não traduzida no aumento do nível de expressão. (Gráfico 1). No entanto, com exceção da seqüência promotora Apro2, todas outras tinham maior expressão no botão floral quando comparados ao controle positivo contendo o promotor CaMV35S duplicado com *enhancer* do AMV.

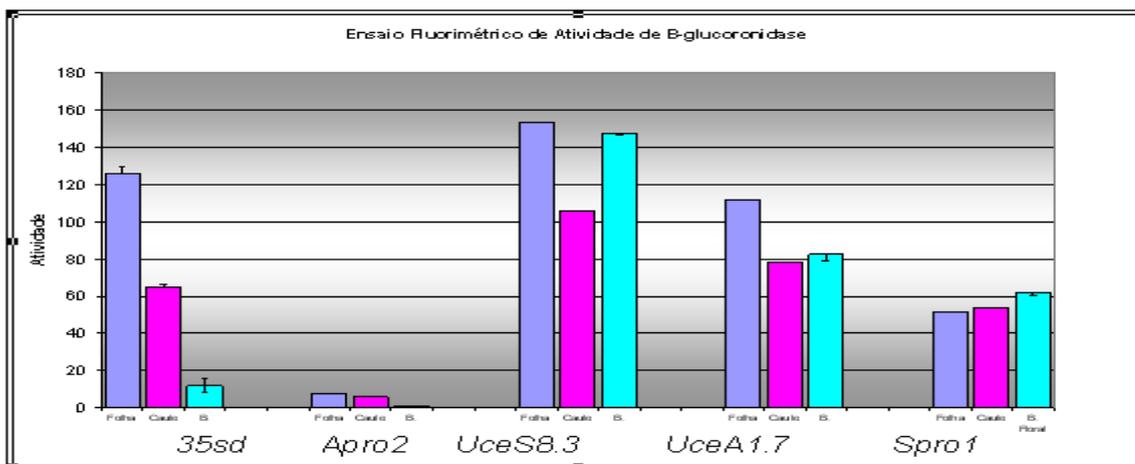


Gráfico 1: Análise quantitativa da expressão do gene GUS sob controle das seqüências das construções contendo os promotores (35SdAMV, UceApro2, UceA1.7, UceSpro1, UceS8.3), através do Ensaio Fluorimétrico de atividade de β -glucuronidase utilizando o extrato protéico das diferentes partes da planta (folha, caule e botão floral) de *A. thaliana* transformada.

PERSPECTIVAS

Plantas de *A. thaliana* transformadas com os promotores 35Sd, UceA1.7 e UceS8.3, e inoculadas com nematóide *M. incognita*, estão em casa de vegetação, onde serão processadas segundo a metodologia prescrita por HUSSEY e BARKEY, 1973. Cerca de 40 dias após o inóculo, será analisada a expressão dos promotores nas plantas transformadas. Os promotores serão avaliados e utilizados na transformação de plantas importantes como a soja e algodão.

BIBLIOGRAFIA

- BATISTA, J. A. N.; GROSSI DE SÁ, M. F. 2000. 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 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.
- GROSSI DE SÁ, M.F.; GUIMARÃES, L.M.; VIANA, A.A.B.; BATISTA, J.A.N; FRAGOSO, R.R. Composições e métodos para modificar a expressão de genes usando o promotor do gene da proteína de conjugação à ubiquitina de plantas de soja. **Patente depositada INPI N. 012070000115**, 2006.
- GROSSI DE SÁ, M.F.; GUIMARÃES, L.M.; VIANA, A.A.B.; BATISTA, J.A.N.; FRAGOSO, R.R. Composições e métodos para modificar a expressão de genes usando o promotor do gene da proteína de conjugação à ubiquitina de plantas de algodão. **Patente depositada INPI N. 012070000116**.
- JAMES, C. Global status of commercialized transgenic crops. **ISAA**, 2006.
- 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.

CONSTRUÇÃO DE VETORES PARA TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE ALGODOEIRO VISANDO RESISTÊNCIA A INSETOS-PRAGA

Lourenço, I.T.¹; Fragoso, R. R.²; Rocha, T.L.³; Grossi-de-Sá, M.F.³

¹UnB – Universidade de Brasília; ²EMBRAPA Cerrados; ³EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia. isabelatl@cenargen.embrapa.br

RESUMO

A cultura do algodão é uma das principais atividades agrícolas no Brasil. Em 2006, a produção nacional de algodão ocupou 1.062,3 mil hectares e apresentou uma produtividade de 1.335 Kg/ha, quando 64,6% da produção foi obtida na região Centro-Oeste. No entanto, sua susceptibilidade a insetos-praga gera perdas na produção, o que representa um grande problema econômico. O coleóptero *Anthonomus grandis*, ou bicudo do algodoeiro, tem crescido em importância no Cerrado, sendo considerado a praga-chave do algodoeiro. O controle de insetos com agrotóxicos pode chegar a 25% do custo de produção. Atualmente, a estratégia mais promissora para o controle de insetos-praga é o desenvolvimento de cultivares de algodão GM expressando proteínas entomotóxicas. Em 2004, 22% da área nacional destinada a cotonicultura foi plantada com algodão GM. Os transgenes selecionados para a transformação de algodoeiro no Laboratório de Interação Molecular Planta-Praga (LIMPP) foram *cry11a12* e *cry8Ha*, que codificam proteínas cristais de *Bacillus thuringiensis*, e *btc1*, codificador de um potente inibidor de serino proteinases, isolado de *Vigna unguiculata*.

INTRODUÇÃO

O plantio de lavouras Geneticamente Modificadas (GM) aumentou significativamente na última década em todo o mundo. Em 2005, a área global de lavouras GM legalmente plantada era de aproximadamente 90 milhões de hectares, um aumento de 11% em relação ao ano anterior, que era de 81 milhões de hectares. Comparando com o ano de 1996, quando as lavouras transgênicas foram pioneiramente comercializadas, a área global com lavouras GM aumentou mais de 50 vezes (JAMES, 2005). O plantio de lavouras GM no Brasil começou oficialmente em 2002, com a legalização comercial da soja Roundup Ready, produzida pela multinacional Monsanto. Mais recentemente, no início de 2005, a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNbio) decidiu favoravelmente sobre a liberação do plantio comercial e consumo humano e animal do algodão Bollgard 531 (CTNbio, 2005) e, em 2007, autorizou o plantio do milho Liberty Link, resistente a herbicidas.

A cultura do algodão é uma das principais atividades agrícolas de interesse econômico no Brasil. No entanto, sua vulnerabilidade a insetos-praga representa um grande problema para essa importante *commodity*. Uma das principais formas utilizadas para controle dessas pragas consiste no uso de uma bactéria, denominada *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), alternativa que não causa danos ambientais e reduz o gasto com agentes químicos. Essa bactéria produz na sua fase de esporulação cristais (toxinas *cry*) que levam a formação de poros nas células do intestino de insetos-praga (ex: *Anthonomus grandis* e *Spodoptera frugiperda*) (MONNERAT *et al.*, 2004). Estima-se atualmente que o plantio de culturas Bt foi empregado em 19,0 milhões de hectares (19%) e 13,1 milhões de hectares (13%) com tratamento combinado do produto Bt e tolerância a herbicidas (JAMES, 2006). É importante ressaltar que as toxinas do *Bacillus thuringiensis* são inócuas aos mamíferos e outros invertebrados e também não são tóxicas para plantas (SHIMADA *et al.*, 2003).

Os genes escolhidos para realização desse trabalho foram *Cry11a12* e *Cry8Ha*, isolados de *Bacillus thuringiensis*, que codificam proteínas cristais tóxicas para insetos, e *BTC1*, que codifica um potente inibidor de proteases digestivas de insetos, isolado de *Vigna unguiculata*. Assim, o objetivo do presente trabalho foi construir vetores para transformação de algodoeiro contendo os genes de interesse para que, no futuro, sejam obtidas plantas com resistência a insetos-praga.

MATERIAL E MÉTODOS

Produção de DNA plasmidial

Os genes de interesse foram clonados em plasmídeos, que foram inseridos em células bacterianas para sua multiplicação em larga escala. O DNA plasmidial foi então extraído de acordo com o protocolo de lise alcalina.

Tratamento com enzimas de restrição

No geral, cada 30µg de DNA foram digeridos com 5 unidades de enzima de restrição (endonucleases), com tampão e temperatura de incubação específicos, conforme sugestão do fabricante (Invitrogen ou Biolabs).

Purificação de DNA do gel de agarose

Fragmentos distintos gerados pela digestão dos plasmídeos foram separados por massa molecular por meio de eletroforese em gel de agarose 1%. Os fragmentos de interesse foram excisados do gel e, posteriormente, purificados para a remoção da agarose e do brometo de etídeo, usando o kit GeneClean II (Bio101).

Tratamento com Klenow

Para gerar extremidades abruptas, o DNA foi tratado com o fragmento maior da DNA polimerase de *E. coli*, ou Klenow. Essa enzima polimeriza dNTPs quando a extremidade é 5' protuberante ou excisa nucleotídeos quando a extremidade é 3' protuberante. A reação padrão utilizada inclui Klenow, dNTPs, tampão específico e é incubada a 25° C durante 15 minutos.

Tratamento com CIP (Calf Intestine Phosphatase)

Para evitar a re-ligação de vetor sem inserto, foi realizada a reação padrão de retirada de fosfatos das extremidades 5', que utiliza CIP, tampão APB e é incubada a 37° C durante uma hora.

Reação de ligação

Os genes de interesse e os vetores de expressão foram ligados num sistema padrão com enzima T4 DNA Ligase, tampão e foram incubados a 15 ° C durante 24 horas.

Transformação de bactéria

O sistema de ligação foi dialisado em membrana e seu volume foi reduzido em SpeedVac para a transformação de bactérias. Os padrões de transformação foram: cubetas de 0,1cm entre os eletrodos, com eletroporador BioRad seguindo os parâmetros: 25µF, 400Ω e 1,8kV. As células transformadas foram semeadas e incubadas a 37 ° C durante 16 horas.

Reação de Polimerização em Cadeia (PCR)

A amplificação dos genes de interesse foi realizada pela técnica de PCR utilizando temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos entre 55° C e 65° C. Os fragmentos amplificados foram analisados em gel de agarose 1%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as construções para transformação de plantas aqui apresentadas foram planejadas com base em um vetor previamente montado no Laboratório de Transferência e Expressão de Genes (LTG), que foi denominado de pCACA (Figura1). Esse vetor resulta da junção do plasmídeo comercial pCAMBIA2300, para transformação de plantas, com um cassete de expressão. Este último apresenta um promotor duplicado, constitutivo e forte, de origem viral (35SdCaMV), uma região 5' não traduzida (5'UTR) de vírus com potencial de aumentar a taxa de tradução (AMV), um sítio múltiplo de clonagem do pUC19, seguido de uma região terminadora de transcrição (tNOS). Esse vetor base foi utilizado para clonagem dos genes *btc1* (inibidor de proteases digestivas de insetos), *cry11a12* (proteína tóxica para insetos) e *cry8Ha* (proteína tóxica para insetos) nos plasmídeos, respectivamente denominados pBTC1 (Figura 3), pCRY1 (Figura 5), pCRY8 (Figura 6) e pBI (Figura 10).

Posteriormente, uma quinta construção foi realizada com o objetivo de avaliar a expressão do gene *Cry11a12*, sob controle de outro promotor, denominado UCEA. Esse promotor foi isolado a partir da sequência protéica da enzima de conjugação à ubiquitina de algodão e tem mostrado uma alta expressão em todas as regiões da planta, principalmente no botão floral. Esse vetor foi construído a partir do já existente, pCRY1, que teve o promotor 35SdCaMV substituído pelo UCEA, e foi denominado de pUCEACRY1 (Figura 12).

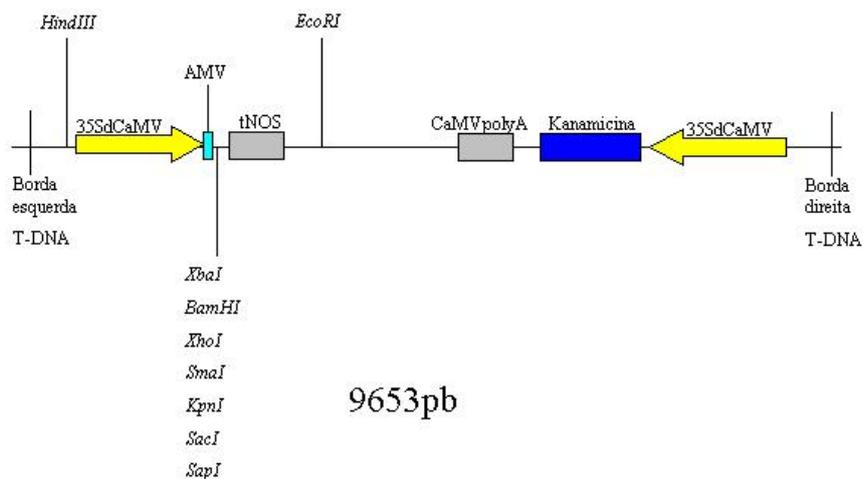
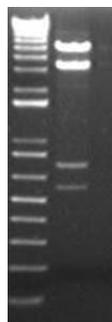


Figura 01: Representação esquemática do vetor contendo o cassete de expressão destinado a transformação da planta de interesse agrônômico (algodoeiro). A montante, em seta amarela, está representado o promotor 35sD de CaMV duplicado e, em azul claro, a região potencializadora de tradução AMV. A jusante, em azul escuro, a seqüência terminadora tNOS. Após a região AMV estão as enzimas de restrição do sítio múltiplo de clonagem. A marca de seleção para as plantas transformadas é o gene *nptII*, que confere resistência ao antibiótico Kanamicina.

A



B

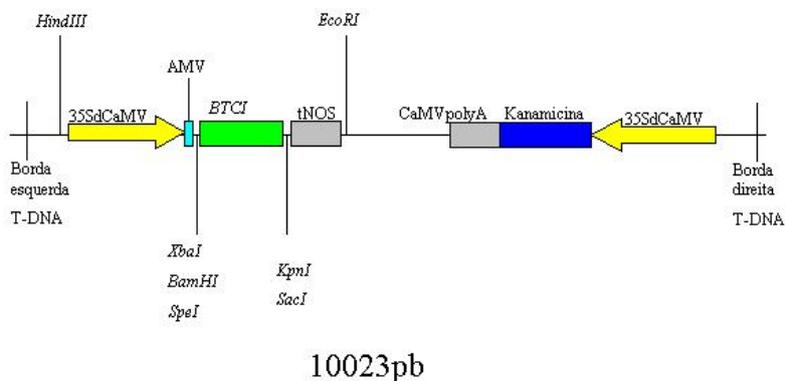
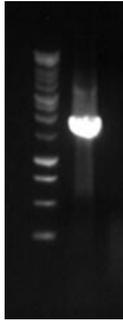
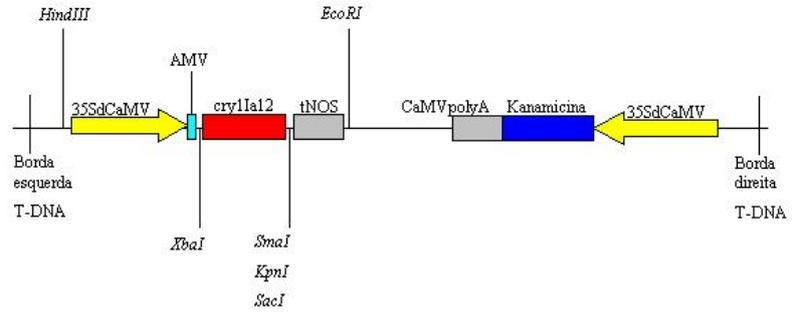
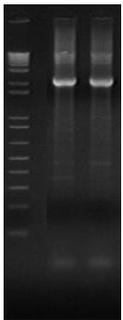
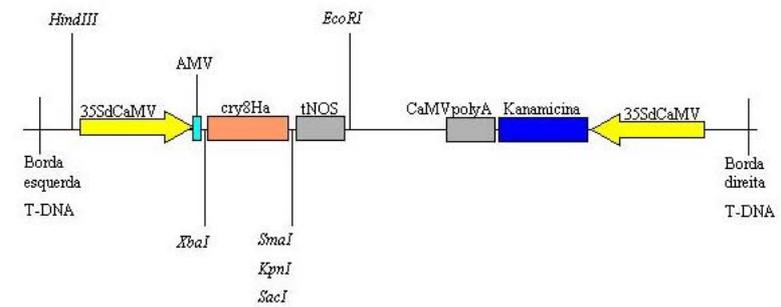


Figura 02. Construção do pBTCl. **(A)** Eletroforese da digestão do pCACA confirmando a presença do *BtCI*. **(B)** Representação esquemática do vetor contendo o gene *btcI* que codifica um potente inibidor de proteases digestivas de insetos, isolado de *Vigna unguiculata*.

A**B**

11598pb

Figura 03. Construção do pCRY1. **(A)** Eletroforese do produto de PCR de colônia confirmando a presença do gene *Cry1Aa12*. **(B)** Representação esquemática do vetor contendo o gene *cry1Aa12* destinado à transformação de algodoeiro.

A**B**

11598pb

Figura 04. Construção do pCRY8. **(A)** Representação esquemática do vetor contendo o gene *cry8Ha* destinado à transformação da planta de algodão. **(B)** Eletroforese do produto de PCR de dois clones distintos confirmando a presença do gene *Cry8Ha*

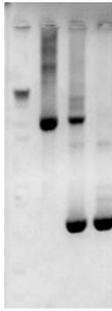
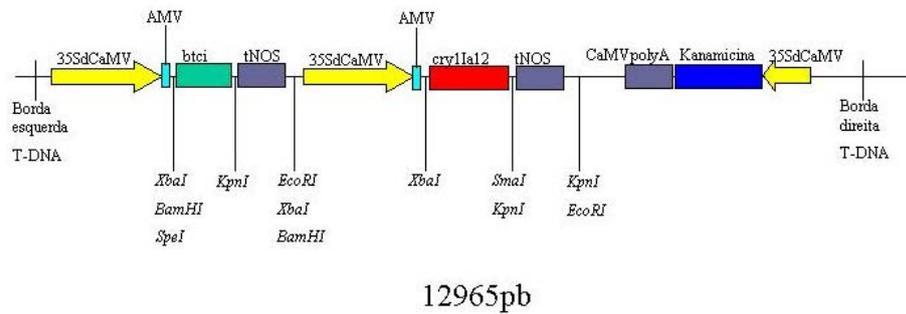
A**B**

Figura 05. Construção do pBTCRY. **(A)** Eletroforese do produto de PCR confirmando a presença dos genes *Cry1la12* e *BTCl* (2). Controle positivo do gene *Cry1la12* (1). Controle positivo do gene *BTCl* (3). **(B)** Representação esquemática do vetor contendo os genes *BTCl* e *Cry1la12*. O vetor pBI foi construído a partir da união do pMONO com o cassete de expressão contendo o gene *Cry1la12*.

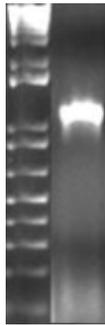
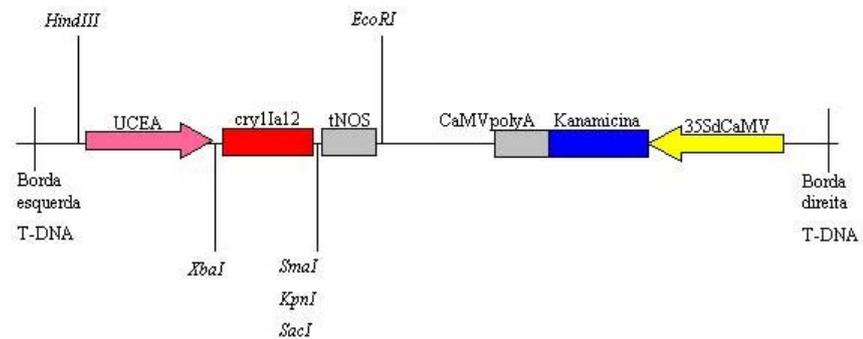
A**B**

Figura 06. Construção do pUCEACRY1. **(A)** Eletroforese da reação de PCR utilizando primers específicos para UCEA confirmando a presença do promotor. **(B)** Representação esquemática do vetor contendo o gene *Cry1la12* sob controle do promotor UCEA.

PERSPECTIVAS

Três vetores foram construídos e cada transgene foi subclonado individualmente (pBTC1, pCRY1 e pCRY8). Adicionalmente, foi construído um quarto vetor (pBI) dotado de dois cassetes de expressão, codificadores de *btc1* e *cry11a12* e outro utilizando o promotor UCEA no controle da expressão do gene *cry11a12* (pUCEACRY1). Todos vetores já estão sendo utilizados na transformação de algodão via tubo polínico e via *Agrobacterium tumefaciens*. Futuros bioensaios *in planta* fornecerão dados relativos à eficiência desses transgenes, individualmente ou sinergicamente, como mecanismo de controle dos insetos-praga.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNbio). **Parecer Técnico Prévio Conclusivo N° 513/2005**. Disponível na URL: www.ctnbio.gov.br. Acessado em 27 de maio de 2006.
- JAMES, C. Global Status of Commercialised Transgenic Crops **ISAAA Briefs No.32**: Preview. ISAAA, Ithaca, NY, 2004.
- JAMES, C. Executive Summary of Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: **ISAAA Briefs No. 34**. ISAAA: Ithaca, NY, 2005.
- JAMES, C. Executive Summary of Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: **ISAAA Briefs No. 35**. ISAAA: Ithaca, NY, 2006.
- MARTINS, E.S.; PRAÇA, L.B.; DUMAS, V.F.; MONNERAT, R.G. Desenvolvimento de metodologia de bioensaio de dose contra o bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis* Boheman, 1843) utilizando estirpes de *Bacillus thuringiensis*. **Comunicado técnico 108**, série Embrapa, 2004.
- SHIMADA, N; KIM, Y.S.; MIYAMOTO, K.; YOSHIOKA, M.; MURATA, H. Effects of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin on mammalian cells. **Journal Veterinary Medical Science** v. 65, n.2, p.187-191, 2003.
- VAIN, P. Global trends in plant transgenic science and technology (1973–2003). **Trends in Biotechnology**, v. 24, p. 206–211, 2006.

TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE PLANTAS DE ALGODÃO VIA TUBO POLÍNICO COM O GENE *cry1a12* VISANDO RESISTÊNCIA A INSETOS-PRAGA

Costa, P.H.A.^{1,2}; Oliveira Neto, O.B.^{1,4}; Oliveira, R.S.^{1,3}; Grossi-de-Sá, M.F.¹

¹EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia; ²UnB – Universidade de Brasília; ³UCB – Universidade Católica de Brasília, ⁴Centro Universitária Unieuro.
costapha@cenargen.embrapa.br

RESUMO

A demanda brasileira e mundial das indústrias têxteis pela fibra do algodão vem crescendo acentuadamente. Entretanto, a produção nacional de algodão tem sido afetada por diversos fatores, entre os quais se destacam as constantes perdas ocasionadas pelo ataque de insetos-praga, sobretudo do bicudo-do-algodoeiro. O presente trabalho teve como objetivo a transformação de plantas de algodão, via tubo polínico, com genes codificadores para proteínas entomotóxicas (proteínas Cry) com atividade para os principais insetos que atacam as plantas de algodão. Cerca de 600 botões florais foram microinjetados, obtendo-se ao todo 3.175 sementes. Destas, 92 foram germinadas e as plantas foram desafiadas pelo teste de resistência a canamicina, sendo que 13 plantas não apresentaram sinal de sensibilidade ao antibiótico. Estas plantas foram analisadas por PCR, que demonstrou a presença da banda correspondente ao gene *cry1a12* em quatro delas. As plantas selecionadas estão sendo submetidas a análises moleculares e a bioensaios com os insetos-alvo.

INTRODUÇÃO

O agronegócio é hoje a principal locomotiva da economia brasileira. É responsável por 33% do Produto Interno Bruto (PIB), 42% das exportações totais e 37% dos empregos gerados no Brasil. Entre 1995 e 2006, a taxa de crescimento do PIB agropecuário foi de aproximadamente 5% ao ano, sendo que em 2006 as vendas externas de produtos agropecuários renderam ao Brasil US\$ 49 bilhões (IBGE/CONAB, 2007). Neste contexto, o algodão vem assumindo um importante papel. A cotonicultura brasileira tem crescido especialmente na região Centro-Oeste do país. Atualmente, a produção nacional de algodão é de 3,7 milhões de toneladas, das quais 38,8% (1,4 milhão de toneladas) são de pluma e 61,2% (2,3 milhões de toneladas) são de caroço de algodão. Essa produção supera em 36,0% a da safra anterior (IBGE/CONAB, 2007).

Apesar do crescimento na produção de algodão nos últimos anos, a demanda brasileira e mundial das indústrias têxteis pela fibra vem crescendo acentuadamente, e o Brasil ainda é afetado por grandes perdas de produção, ocasionadas principalmente pelo ataque de insetos-praga. Atualmente, o bicudo-do-algodoeiro é a principal praga que afeta a produtividade de algodão. Este inseto-praga foi introduzido no país pelo estado de São Paulo, em 1983, e causou grande impacto na economia nacional, especialmente na região nordestina (COSTA & BUENO, 2004). A expansão deste inseto nos Estados de Goiás, Minas Gerais, Bahia e em algumas áreas de Mato Grosso, vem causando enormes prejuízos. A fase larval deste inseto é endofítica – se desenvolve no interior dos botões florais e das maçãs do algodoeiro –, o que impossibilita seu controle por meio do uso de pesticidas, os quais, além de onerosos e prejudiciais ao meio ambiente, são, neste caso, ineficientes. Portanto, o estabelecimento de uma nova tecnologia que permita o desenvolvimento de plantas resistentes ao bicudo-do-algodoeiro abrirá novas possibilidades no esforço de se controlar este inseto-praga.

Atualmente, diferentes métodos para a transformação de plantas estão disponíveis, incluindo as transformações via *Agrobacterium tumefaciens*, biobalística e eletroporação (HALFORD, 2006). Entretanto, uma das etapas mais complicadas para a obtenção de plantas geneticamente transformadas é o estabelecimento de um sistema eficiente e reproduzível de regeneração *in vitro* das plantas. Cada espécie vegetal – ou mesmo diferentes genótipos dentro de uma mesma espécie – apresenta exigências nutricionais e hormonais particulares para ser regenerada. Alguns genótipos são tão resistentes ao processo de regeneração que se tornam quase inviáveis aos métodos de transformação (MATHER & ROBERTS, 2004).

Com respeito à transformação de plantas de algodão, tem-se encontrado enormes dificuldades devido ao fato desta planta ser recalcitrante. As técnicas normalmente usadas para transformação genética não apresentam sucesso em todas as variedades de algodão, sendo as comerciais as mais prejudicadas. Devido a essas dificuldades, quaisquer métodos alternativos para obtenção de plantas geneticamente modificadas, que não exigem protocolos de regeneração de plantas, são promissores. O método introdução de DNA exógeno em um embrião de algodoeiro via tubo polínico, após a polinização, foi desenvolvido há cerca de 20 anos (ZHOU *et al.*, 1983) e vem sendo utilizado com sucesso na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – CENARGEN. O presente trabalho teve como objetivo transformar plantas de algodão por meio da técnica do tubo polínico com gene codificador para uma proteína

entomotóxica (proteína cry1Ia12) com atividade para o bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis*) e a lagarta do cartucho (*Spodoptera frugiperda*).

MATERIAL E MÉTODOS

Construção do vetor

O gene *cry1Ia12* foi isolado previamente da linhagem 811 do *B. thuringiensis*, o qual teve sua seqüência de nucleotídeos originais modificada para expressão em plantas de algodão. O gene foi subclonado num cassete contendo o promotor duplicado 35S do vírus do mosaico da couve flor (CaMV35Sd) com a região *enhancer* do vírus do mosaico da alfafa (AMV), de expressão constitutiva, e o terminador do gene da sintetase do óxido nítrico (NOS). Este cassete foi inserido num vetor da série pCAMBIA (pC2300). O DNA do vetor pC2300Cry1Ia12 foi preparado na concentração final de 100ng/ μ L em água milli-Q.

Transformação do algodoeiro via tubo polínico

Os experimentos de microinjeção do DNA nos botões florais foram conduzidos em casa de vegetação, utilizando-se plantas de algodoeiro herbáceo (*G. hirsutum* L.), cv. BRS Cedro. As microinjeções foram realizadas com uma micro-seringa do tipo Hamilton em 60 plantas, nos horários de menor insolação, num período de quatro meses. Cada botão floral recebeu uma microinjeção de cerca de 1,0 μ g de DNA. Após a produção, as sementes foram colhidas e submetidas a um teste preliminar de seleção. Este procedimento se constituiu na semeadura das sementes e no desafio das plântulas, utilizando-se a resistência à canamicina como marcador de seleção. A confirmação dos transformantes foi feita por PCR, com iniciadores para sítios específicos do vetor. Foi realizada uma primeira PCR utilizando-se iniciadores para o promotor CaMV35S e o terminador NOS, sendo o produto desta reação usado numa segunda PCR com os iniciadores específicos para o gene *cry1Ia12*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como demonstrado na Tabela 1, foram microinjetados aproximadamente 600 botões florais num período de quatro meses, dos quais cerca de 300 flores foram abortadas, em média, $12 \pm 4,6$ dias após a microinjeção. As médias de temperatura e a umidade relativa nos momentos das microinjeções foram de $16,8 \pm 3,2$ °C e $73,4 \pm 8,6\%$, respectivamente. Ao todo, foram coletadas 3.175 sementes provenientes dos botões florais microinjetados com o vetor carregando o gene *cry1Ia12*. Destas, até o momento, foram semeadas 92 sementes em sacos plásticos pretos, os quais foram mantidos em casa de vegetação. As plântulas foram analisadas por meio do teste de resistência à canamicina, o qual consistiu na aplicação de canamicina a 5mg/mL nas folhas. Plantas que apresentaram marcas de sensibilidade a canamicina foram descartadas. Das 92 plantas analisadas até o momento, 13 não apresentaram marcas de sensibilidade e foram analisadas por PCR com iniciadores para o gene *cry1Ia12* (Figura 1). Quatro plantas apresentaram a banda correspondente ao gene de interesse e foram selecionadas para posteriores análises moleculares e desafios com os insetos-alvo.

Tabela 1. Resumo dos dados referentes ao experimento de transformação via tubo polínico.

Botões Florais Microinjetados	590
Botões Florais Abortados	315
Botões Florais Remanentes	275
Sementes Obtidas	3.175
Sementes Avaliadas	92
Plantas resistentes à canamicina	13
Plantas PCR positivas	4

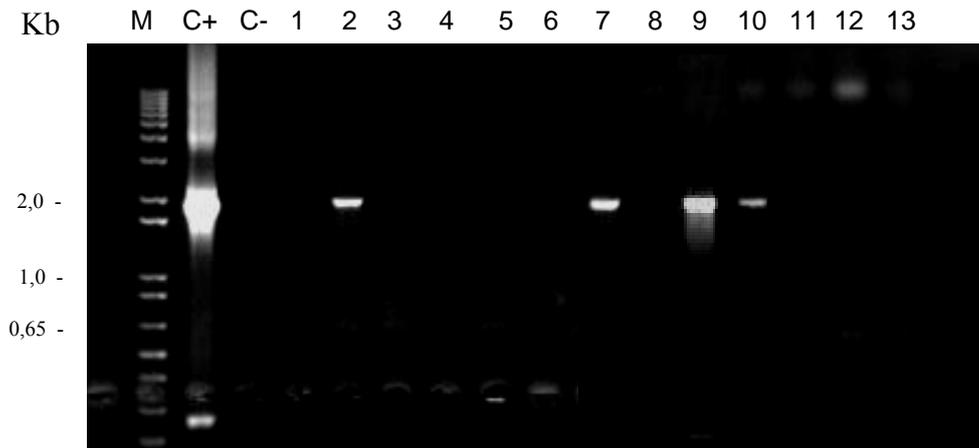


Figura 1. PCR das plantas de algodão resistentes a canamicina. (M) Marcador 1Kb, (C +) Controle Positivo (Vetor), (C-) Planta Selvagem, (1-13) Plantas canamicina-resistentes.

PERSPECTIVAS

A transformação do algodão via tubo polínico tem se mostrado uma alternativa prática aos desafios da cultura de tecido, o qual é requerido em outros sistemas de transformação. Como perspectivas, esperam-se obter novas plantas positivas (geneticamente modificadas) com a análise das demais sementes coletadas dos experimentos de microinjeção dos botões florais. As quatro plantas selecionadas neste primeiro momento estão sendo analisadas por outras técnicas moleculares para a confirmação dos transformantes. Além disso, bioensaios contra bicudo-do-algodoeiro e a lagarta do cartucho estão sendo avaliados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB): www.conab.gov.br. Acessado em: 21/05/2007
- COSTA, S.R.; BUENO, M.G. **A saga do algodão: das primeiras lavouras à ação na OMC**. Ed. Insight Engenharia, Rio de Janeiro, 2004. 144p.
- HALFORD, N. **Plant Biotechnology: current and future applications of genetically modified crops**. Ed. John Wiley & Sons, 2006. 316p.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE ESTÁTICA E GEOGRAFIA (IBGE): www.ibge.gov.br. Acessado em: 21/05/2007.
- MATHER, J.P.; ROBERTS, P.E. **Introduction to Cell and Tissue Culture: Theory and Technique**. Ed. Plenum Press, New York, 1998. 314p.
- ZHOU, G.; WANG, J.; ZENG, Y.; HUANG, J.; QIAN, S.; LIU, G. Introduction of exogenous DNA into cotton embryos. **Methods in Enzymology**, v. 101, p. 433–448, 1983.

TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE *Coffea arabica* COM INIBIDORES DE ALFA-AMILASE

Barbosa, A.E.A.D.^{1,2}; Barros, E.V.S.A.¹; Teixeira, J.B.¹; Grossi de Sá, M.F.^{1,2}

¹EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília, DF. ²UCB - Universidade Católica de Brasília. Brasília, DF.

aulusb@yahoo.com

RESUMO

O Brasil é o maior produtor mundial de café, detendo 36% do mercado, sendo as espécies *Coffea arabica* e *Coffea canephora* as mais comercializadas. As plantações de café são atacadas por uma série de pragas agrícolas, e a principal delas é a broca-do-café (*Hypothenemus hampei*). Este coleóptero é bastante difícil de ser controlado, pois passa todo o ciclo de vida protegido dentro do fruto do café. O seu controle é restrito à utilização de inseticidas, que são carcinogênicos e tóxicos para o meio ambiente. Experimentos *in vitro* mostraram que o inibidor α -AI1 do feijão *Phaseolus vulgaris* inibe a atividade das duas α -amilases presentes no trato intestinal da broca-do-café. Recentemente, um outro inibidor de α -amilase presente em acessos do feijão selvagem *Phaseolus coccineus* (α IPC) mostrou-se altamente ativo contra as α -amilases deste inseto-praga. A disponibilidade de genes e de técnicas eficientes para transformar geneticamente *C. arabica* e *C. canephora* tornou possível a obtenção de plantas transformadas de café com o gene do inibidor α -AI1, e de embriões selecionados com o inibidor α IPC para o controle da broca-do-café. Utilizando-se a técnica de biobalística em calos embriogênicos de *C. arabica*, foram obtidas seis plantas positivas para o gene α -AI1, identificadas via Southern blot. Estas plantas apresentaram baixo número de cópias, sendo quatro delas com uma cópia e duas plantas com duas cópias do gene. Duas das plantas positivas por Southern blot estão produzindo frutos e logo a avaliação do nível de expressão do inibidor α -AI1 e a atividade dos frutos transgênicos no controle da broca-do-café serão analisadas. Os calos embriogênicos de *C. arabica* e *C. canephora* transformados com o inibidor α IPC estão em meio de indução de regeneração de embriões. Os resultados destes estudos poderão resultar em cultivares resistentes à broca-do-café e menos impactantes ao meio ambiente, tornando o café brasileiro mais competitivo no mercado internacional.

INTRODUÇÃO

O café é uma importante fonte de renda para a economia do Brasil, tendo uma produção estimada para 2006 de 2.535.768 toneladas, sendo os estados de Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Paraná e Bahia, os maiores produtores nacionais (IBGE, 2006). Essa produção corresponde a 36% do mercado mundial e faz do Brasil o principal produtor e o segundo maior consumidor, atrás apenas dos Estados Unidos (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2003).

As espécies *C. arabica* e *C. canephora* são as mais cultivadas, correspondendo, respectivamente, a 65% e 35% do mercado internacional. Ambas as espécies são afetadas pela broca-do-café (Ferrari, 1867), que é a praga de maior importância para esta cultura.

As infestações da cafeicultura pela broca-do-café causam muitos prejuízos ao Brasil. No Estado do Espírito Santo, por exemplo, a broca-do-café causou a destruição de aproximadamente 154 mil sacas de café no ano 2000, totalizando cerca de R\$ 40 milhões que deixam de circular anualmente na economia do estado (INCAPER, 2000). A espécie *C. canephora* é a mais susceptível ao ataque da broca, provavelmente porque apresenta uma floração irregular durante todo o ano, sempre com frutos em diferentes estágios de desenvolvimento, e seu plantio é realizado em regiões quentes, características que favorecem o ciclo do inseto (FILHO e MAZZAFERA, 2003).

Valencia e colaboradores (VALENCIA *et al.*, 2000) demonstraram, em experimentos *in vitro*, que o inibidor α -AI1, isolado de sementes de *P. vulgaris*, inibe a atividade das duas α -amilases, presentes na broca-do-café. Recentemente, um outro inibidor de α -amilase, isolado de sementes de um acesso do feijão selvagem (*P. coccineus*), mostrou-se também muito eficiente na inibição das α -amilases da broca-do-café (PEREIRA *et al.*, 2006). Visando o controle dessa importante praga da cafeicultura, o objetivo deste trabalho é a utilização dos genes para os dois inibidores de α -amilases (α AI-I e α AI-Pc) no desenvolvimento de plantas transgênicas de café. Os estudos existentes envolvendo transformação de café (HATANAKA *et al.*, 1999; DUFOUR *et al.*, 2000; OGITA *et al.*, 2002; ROSILLO *et al.*, 2003) e o recente estabelecimento da técnica de transformação genética de *C. arabica* (CUNHA *et al.*, 2007) contribuíram para a obtenção de plantas de café geneticamente transformado.

MATERIAL E MÉTODOS

Construção dos Vetores

Foi construído um vetor com o gene do inibidor α AI-1 de *P. vulgaris* utilizando-se o vetor pBIN19, sob controle do promotor e terminador da fitohemaglutinina (Figura 1A) (GROSSI-DE-SÁ *et al.*, 1997). Um segundo vetor foi desenvolvido a partir do vetor pCAMBIA2300 com o inibidor α IPC, também sob o controle do promotor semente específico da fitohemaglutinina (Figura 1B).

Transformação das plantas de café

A transformação de *C. arabica* cv catuaí vermelho foi feita por meio da técnica de biobalística, utilizando-se um protocolo publicado recentemente (CUNHA *et al.*, 2007). Cerca de 50mg de calos embriogênicos, produzidos por indução de embriogênese somática de fragmentos foliares, foram utilizados em cada placa dos seis experimentos de bombardeamento. Após o bombardeamento, os calos foram transferidos para meios seletivos e de regeneração, até o desenvolvimento de plântulas, as quais foram transferidas para casa de vegetação.

Análise molecular das plantas de café transformadas

As potenciais plantas transformadas de café foram analisadas via PCR e *Southern blot*. Foram realizadas PCRs para verificar a presença do gene de resistência ao antibiótico canamicina, e *Southern blot* para identificar as plantas que integraram em seu genoma os respectivos genes inibidores de α -amilases.

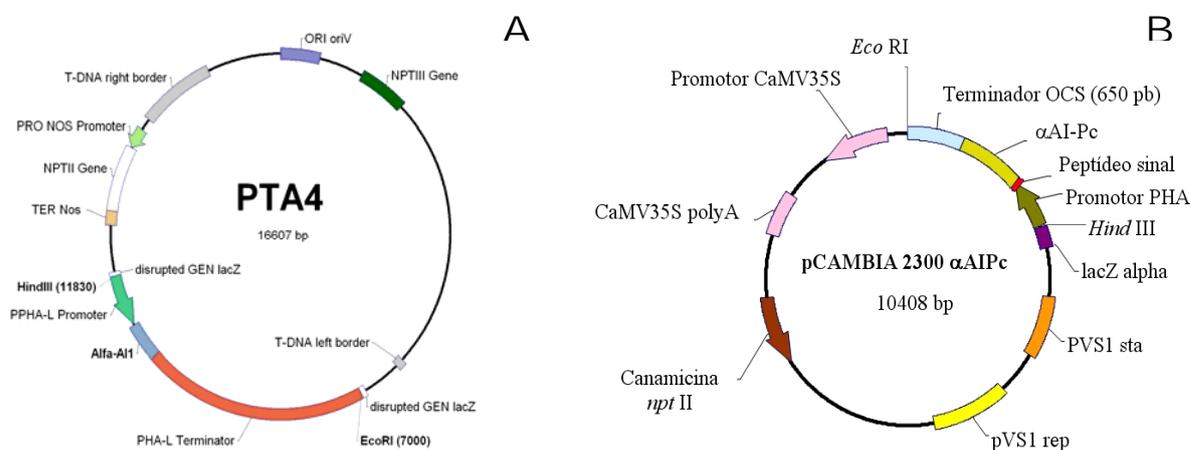


Figura 1. A - Vetor pTA4 construído para a transformação de plantas de café com o inibidor α AI-1 e o promotor e terminador da fitohemaglutinina (PHA-L). B – Vetor pCAMBIA2300 α AIPc, construído com o inibidor α AIPc, promotor da fitohemaglutinina e terminador OCS.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O experimento de transformação de *C. arabica* com o vetor pCAMBIA2300 α AIPc gerou embriões primários mesmo sob seleção do antibiótico canamicina a 400mg/l, o que indica a transformação dos calos embriogênicos (Figura 2A e B).

O experimento de transformação via biobalística gerou quinze plantas de café, sendo que em seis delas foi demonstrada a integração do gene do inibidor α AI-1 por *Southern blot*. Cinco das seis plantas transformadas apresentaram uma única cópia do gene α AI-1 inserido no genoma da planta, e duas apresentaram duas cópias (Figura 3, linhas 1 e 2). Este baixo número de cópias introduzido é incomum em métodos de transformação por biobalística, mas, por questões de biossegurança, é ideal para plantas que serão utilizadas na produção agrícola. Duas dessas plantas modificadas geneticamente estão em fase de frutificação, e seus frutos serão brevemente desafiados contra a broca-do-café (Figura 4).

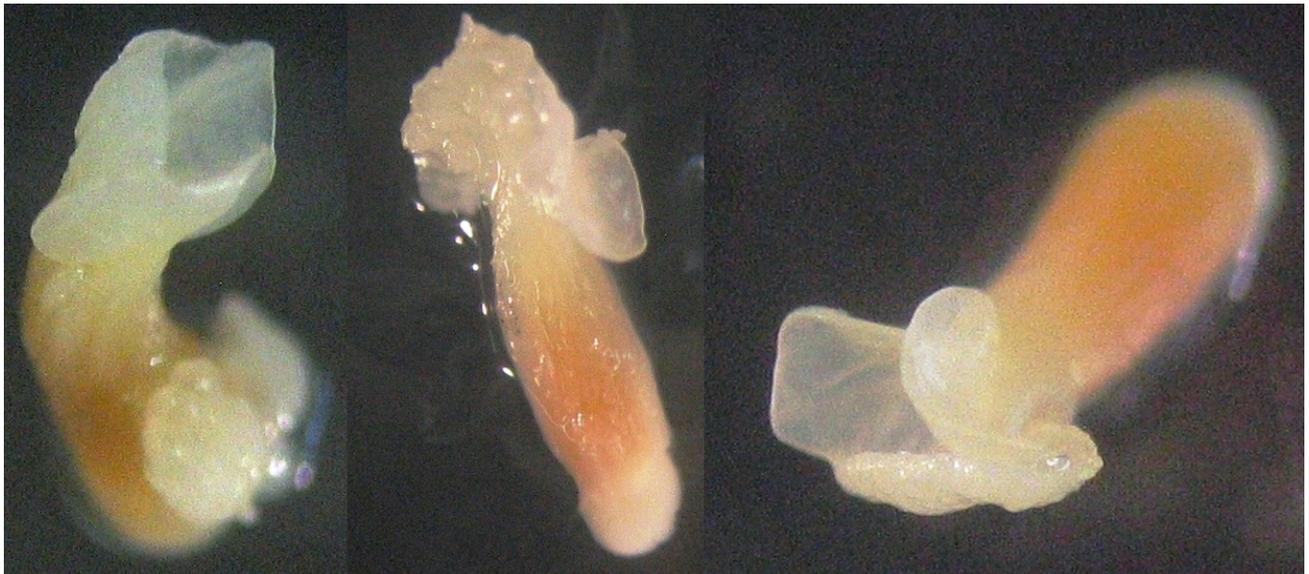


Figura 2. Embriões de *Coffea arabica* obtidos da transformação com o plasmídeo pCAMBIA2300 α AIPc, que leva o gene para o inibidor de α -amilase do feijão selvagem *Phaseolus coccineus* e o gene de resistência ao antibiótico canamicina.

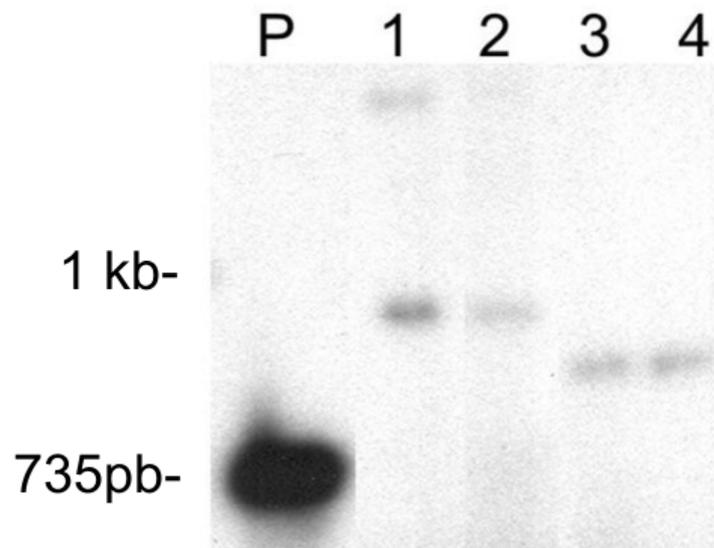


Figura 3. Análise por *Southern blot* de plantas de *C. arabica* transformadas com o plasmídeo pTA4. P: fragmento α A1-1 como controle positivo; 1-4: plantas de café transformadas.



Figura 4. (A) Plantas transformadas de *C. arabica* com 1 ano e meio na casa de vegetação. (B) Flores das mesmas plantas. (C) Frutos das mesmas plantas de café após 3 meses da florescência.

CONCLUSÕES

Os dados mostram que a transformação de *C. arabica* via biobalística é adequada para o desenvolvimento de plantas com novas características de interesse biotecnológico. Neste trabalho, foram obtidas, até o momento, seis plantas transgênicas de café para o inibidor α -AI1 de *P. vulgaris*, sendo duas delas com duas cópias e quatro com apenas uma cópia do gene. Todas as plantas apresentaram fenótipo normal e estão produzindo frutos normalmente, o que mostra que a expressão do inibidor α -AI1 não interfere na fisiologia da planta. Portanto, o inibidor α -AI1 tem potencial para controlar a broca-do-café. As perspectivas para os estudos futuros incluem a análise molecular das plantas transformadas de *C. arabica* contendo o gene α AI-1 de *Phaseolus vulgaris* via ELISA e Western blot, e a realização de bioensaios desafiando os frutos com a broca-do-café para avaliar a eficiência do inibidor no controle do inseto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CUNHA, W.G.; MACHADO, F.R.B.; BARBOSA, M.F.F.; TEIXEIRA, J.B.; VIANNA, G.R.; SÁ, M.F.G.; BARROS, E.V.S.A. *Coffea Arabica* Plants Genetically Modified Throug Bombardment. **Plant Science** (Submetido), 2007
- DUFOUR, M.; LEROY, T.; CARASCO-LACOMBE, C.; PHILIPPE, R.; FENOUILLET, C. Coffee (*Coffea* SP.) Genetic Transformation for Insect Resistance. **Coffee Biotechnology and Quality**. p.209-217, 2000.
- FILHO, O.G.; MAZZAFERA, P. Caffeine and Resistance of Coffee to the Berry Borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). **Journal. Agricultural Food Chemistry** 51: 6987-6991, 2004
- HATANAKA, T.; CHOI, Y. E.; KUSANO, T.; SANO, H. Transgenic plants of coffee *Coffea canephora* from embryogenic callus via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. **Plant Cell Reports**, v.19, p. 106-110, 1999
- OGITA, S.; UEFUJI, H.; CHOI, Y.-E.; HATANAKA, T.; OGAWA, M.; YAMAGUCHI, Y.; KOIZUMI, N.; SANO, H. Genetic Modification of Coffee Plants. **Journal of Plant Biotechnology**, v. 4, n.3, p. 91-94, 2002.
- PEREIRA, R.A.; BATISTA, J.A.N.; SILVA, M. C. M.; OLIVEIRA-NETO, O. B.; FIGUEIRA, E. L. Z.; VALNECIA, A. J.; GROSSI-DE-SÁ, M.F. An alpha-amylase inhibitor gene from *Phaseolus coccineus* encodes a protein with potential for control of coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*). **Phytochemistry**, v. 67, p. 2009–2016, 2006
- VALENCIA, A., BUSTILLO, A.E., OSSA, G.E., CHRISPPEELS, MJ. α -Amylases of the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) and their inhibition by two plant amylase inhibitors. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v. 30, p. 207–213, 2000
- ROSILLO, A.G.; ACONA, J.R.; GAITAN, A.L.; PENA, M. Optimized DNA delivery into *Coffea arabica* suspension culture cells by particle bombardment. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 74, p. 45-49, 2003
- GROSSI_DE SÁ, M.F.G.; MIRKOV, T.E.; ISHIMOTO, M.; COLUCCI, G.; BATEMAN, K.S.; CHRISPPEELS, M.J. Molecular characterization of a bean a-amylase inhibitor that inhibits the alpha-amylase of the Mexican bean weevil *Zabrotes subfasciatus*. **Planta**, v. 203, p. 295-303, 1997.

ANÁLISE PROTEÔMICA COMPARATIVA DE DIFERENTES FASES DE DESENVOLVIMENTO DE *Meloidogyne incognita*

Casado-Filho, E.¹; Rocha, T.L.²; Metha, A.²; Noronha, E. F.¹; Grossi-de-Sá, M.F.^{1,2}; Murad, A.M.¹; Franco, O.L.¹; ¹UCB - Universidade Católica de Brasília; ²EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia.

RESUMO

Nematóides fitopatogênicos infestam diversas lavouras, causando severas perdas à agricultura mundial. Esses parasitas invadem as raízes pela região de alongamento, migrando até os tecidos vasculares, onde formam o sítio de alimentação, impedindo o desenvolvimento da planta. Apesar de serem amplamente estudados, muitas questões sobre a formação do sítio de alimentação pelos nematóides de galha permanecem sem elucidação. Diferentes estratégias têm sido usadas para o controle de nematóides, sendo, porém, pouco eficientes e muitas vezes causam danos ao meio-ambiente. Visando o desenvolvimento de novos tratamentos contra *Meloidogyne incognita*, proteínas extraídas de ovos de juvenis de segundo estágio (J2) e de fêmeas foram analisadas comparativamente por meio de eletroforese bidimensional. As amostras de *M. incognita* foram maceradas, ressuspensas em tampão Na₂PO₄ 50mM, pH 7,2 contendo NaCl 30mM, PMSF 2mM e DTT 10mM, e em seguida centrifugadas. O sobrenadante foi precipitado, quantificado e analisado em gel SDS-PAGE 15%. As análises em eletroforese bidimensional foram realizadas em triplicata, usando-se *strips* de 13cm de escala de pH 3-11 não linear. A segunda dimensão foi feita usando-se gel SDS-PAGE 12%. Os géis corados com prata foram digitalizados e analisados no programa *Bionumerics*, gerando dados comparativos e imagens 3D. A identificação dessas proteínas poderá representar um ponto crucial para se entender a interação molecular planta-nematóide, e esses dados poderão ser usados no desenvolvimento de novos compostos efetivos no controle de fitonematóides.

INTRODUÇÃO

Nematóides representam uma das principais pragas da agricultura. São encontrados em todo o mundo, sendo responsáveis pela queda da produção de diversas lavouras de grande importância econômica, como café, soja, algodão e cana-de-açúcar, causando prejuízos da ordem de 100 bilhões de dólares anuais (SASSER & FRECKMAN, 1987). Além do prejuízo no mercado agrícola, eles também representam grande risco a famílias que vivem da agricultura de subsistência, uma vez que podem tornar o solo praticamente incultivável.

O café é uma das culturas mais prejudicadas, principalmente por nematóides de galhas, responsáveis por perdas que podem ultrapassar 15% da produção. Dentre os nematóides de galhas, o *Meloidogyne incognita* é um dos que mais atacam o cafeeiro – causando uma patologia chamada meloidoginose –, e sua distribuição abrange praticamente todos os estados brasileiros. O controle preventivo adotado pelos agricultores não é eficiente, uma vez que a contaminação ocorre por intermédio da água, de mudas ou solo contendo ovos, e até mesmo de ovos levados por animais domésticos e silvestres.

Alguns dos principais sintomas da meloidoginose são: presença de galhas nas raízes, redução e deformação do sistema radicular, decréscimo da eficiência das raízes em absorver e translocar água e nutrientes, menor crescimento da parte aérea, desfolhamento e menor produção, culminando com a morte das plantas. Na maioria das vezes, a infecção só é percebida quando boa parte da lavoura já esta perdida. A infestação da planta é feita pela larva juvenil de segundo estágio (J2), que penetra pela região de alongamento da raiz e migra até os tecidos vasculares (HOFMANN & GRUNDLER, 2006). Nesta região, ele se fixa, e, com auxílio do estilete, introduz nas células próximas as secreções salivares, as quais levam à diferenciação em células de alimentação, formando, assim, os sítios de alimentação (JAUBERT *et al.*, 2002) responsáveis pela formação das galhas radiculares.

Apesar do grande número de estudos sobre o gênero, muitas questões sobre as interações ocorridas durante a fase de infecção permanecem sem explicação. Logo, visando auxiliar no desenvolvimento de tratamentos mais eficientes e menos prejudiciais contra *M. incognita*, foram feitos estudos proteômicos preliminares por meio de eletroforeses comparativas de proteínas de fêmeas, estágio juvenil de desenvolvimento (J2) e ovos.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção de fêmeas, ovos e J₂ de M. incognita

Mudas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) foram infectadas com aproximadamente 10.000 larvas de *M. incognita*. Para a obtenção das amostras de fêmeas de nematóides, foi feita a extração pelo método desenvolvido por CARNEIRO *et al.* (2004). Para a coleta dos ovos, as raízes foram trituradas em solução

de hipoclorito de sódio 0,5% e separadas em peneiras de 50, 200 e 500 mesh. Parte dos ovos retidos na peneira mais fina foi usada para os experimentos, e os restantes foram eclodidos em recipiente com água destilada para obtenção da amostra de J2 (BONETI & FERRAZ, 1981).

Extração aquosa e quantificação protéica de fêmeas, ovos e J2.

As amostras de fêmeas, J2 e ovos de *M. incognita* foram maceradas, com auxílio de nitrogênio líquido, em 250µL de solução tampão contendo Na₂PO₄ 50mM, NaCl 20mM, PMSF (phenyl methyl sulfonyl fluoride) 2mM e DTT (dithiothreitol) 10mM de, pH 7.2 para a extração das proteínas. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 14.000rpm, durante 15 minutos, a 4° C. Os sobrenadantes foram recolhidos e armazenados a -80° C.

Quantificação e precipitação de proteínas

As amostras foram quantificadas pelo método de BRADFORD (1976) e precipitadas com ácido tricloroacético 75% e acetona resfriada. Após a precipitação foi feita diálise por uma noite, em "mini Dialysis kit" da empresa Amersham, membrana de 1kDa.

Análise de massa molecular por eletroforese e análise computacional

Foram aplicados 25µg em SDS-PAGE 15% (LAEMMLI, 1970) e os géis corados com nitrato de prata (BLUM *et al.*, 1987). Para as análises de géis bidimensionais, foram utilizados 100µg de proteína ressuspendidos em tampão de rehidratação contendo 2% CHAPS, 8M de uréia, 7mg DTT e 2% de tampão IPG para pls de 3-11 não linear, marca General Electric. Essa solução foi utilizada para hidratar *strips* de 13cm, pH 3-11, gradiente não linear, durante 16 horas. Para a focalização isoeletrica, as *strips* foram submetidas a uma corrida de 30 minutos a 500V, 30 minutos de 1000 e 380 minutos em 3500V, a 2mA e 5W. Após essa etapa, as *strips* passaram por 15 minutos em solução de equilíbrio composta por 6M de uréia, DTT a 1% e 2% de SDS (MURAD *et al.*, 2006) e então aplicadas sobre um gel SDS-PAGE 12,5% (LAEMMLI, 1970), para separação por massa molecular. O gel passou por uma corrida de 7h a 250V, 80mA e 10W de potência (MURAD *et al.*, 2006), sendo os géis, por fim, corados com nitrato de prata (BLUM *et al.*, 1987). Os géis foram digitalizados e passaram por análise no software BioNumerics versão 4.5, na qual foram geradas imagens comparativas das três fases, como também imagens tridimensionais que ressaltam os principais *spots* de proteínas específicas de cada uma das fases.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os experimentos preliminares em SDS-PAGE (**Figura 1**) revelaram diferenças significativas no padrão protéico das três fases analisadas de *M. incognita*. A amostra de fêmea apresentou uma expressão protéica variando entre 10kDa e 70kDa. A fase de J2 apresentou expressão menos ampla, com proteínas variando de 10kDa a aproximadamente 50kDa, enquanto na fase de ovos houve uma expressão mais ampla, cobrindo uma faixa de 10kDa a mais de 80kDa. As três amostras apresentam bandas protéicas bastante semelhantes na região de 20kDa.

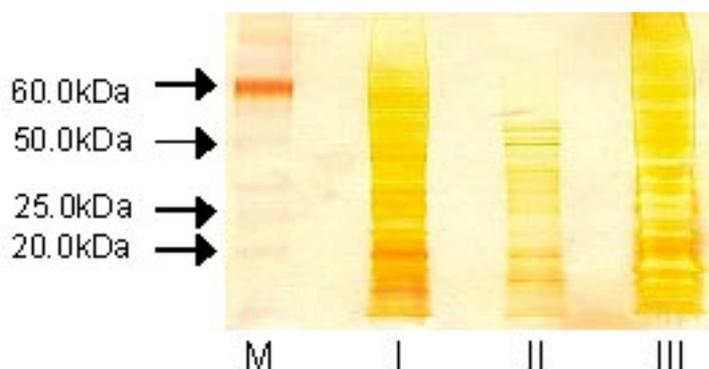


Figura 1. SDS-PAGE a 12% Amostra de Fêmea (I), J2 (II) e Ovos (III). Marcador molecular (M).

Os géis bidimensionais confirmaram as diferenças observadas nos experimentos com SDS-PAGE. A amostra de fêmea (**Figura 2A**) apresentou uma expressão de *spots* mais forte na região próxima ao pH 9.0, enquanto a da fase J2 mostrou um número maior de proteínas visualizadas no gel, sendo possível perceber uma distribuição de proteínas mais homogênea em relação ao ponto isoeletrico (**Figura 2B**). Na análise da fase de ovos (**figura 2C**), foram visualizados poucos *spots*, havendo uma concentração maior

próxima ao pH 8.0. Há uma série de *spots* protéicos semelhantes nas três amostras, localizados principalmente na região levemente básica do gel, próxima de 20kDa, com pH ao redor de 8.0. A partir de uma observação mais apurada dos géis, pode-se perceber *spots* diferenciais presentes apenas em uma determinada fase do desenvolvimento de *M. incognita*. As imagens geradas pela análise computacional demonstram mais claramente essas diferenças. A amostra de fêmea (**Figura 3A**) apresenta predominância dos *spots* diferenciais na região de alto peso molecular, com distribuição homogênea quanto ao pH. A representação de J2 (**Figura 3B**) mostra vários *spots* exclusivos distribuídos, principalmente na faixa próxima a 20kDa, apresentando uma distribuição menos ampla com relação ao pH dos *spots*. A análise de ovos (**Figura 3C**) mostra algumas proteínas distintas, localizadas principalmente próximas a 20kDa e na região básica do gel.

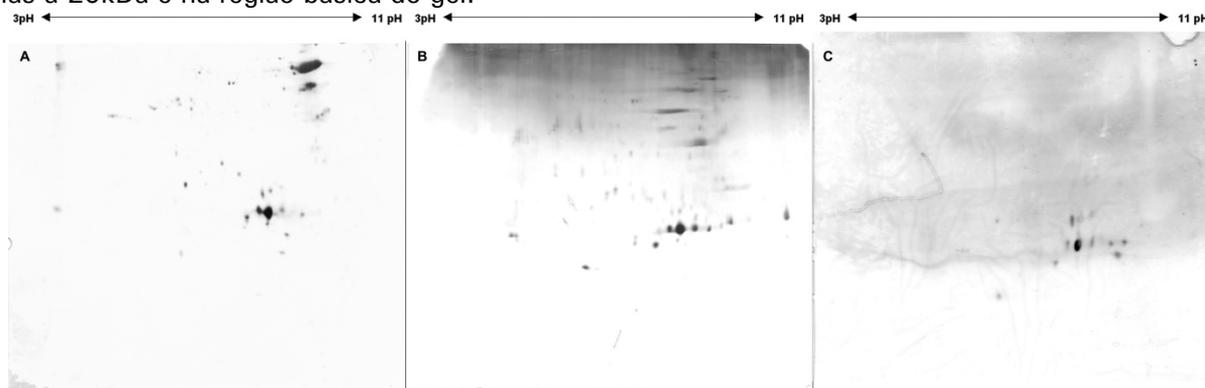


Figura 2. Imagens comparativas de géis bidimensionais de fêmea (A), J2 (B) e ovos (C) de *Meloidogyne incognita*.

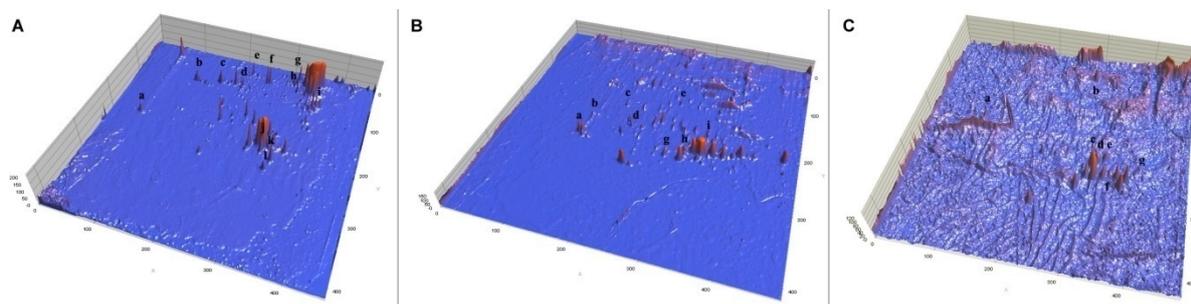


Figura 3. Interpretação computacional dos géis de fêmea (A), J2 (B) e ovos (C) de *Meloidogyne incognita*, com destaque nos spots diferenciais de cada gel.

PERSPECTIVAS

As análises bioquímicas realizadas com *M. incognita* revelaram diferenças significativas na composição protéica das três principais fases do desenvolvimento desse nematóide, apresentando diversas proteínas presentes exclusivamente em uma única fase do desenvolvimento. A identificação dessas proteínas pode levar elucidar questões relacionadas à interação planta-parasita, assim como servir de alvo para tratamentos voltados ao combate de cada fase, que sejam mais eficientes e menos danosos ao meio ambiente. Experimentos de espectrometria de massa estão sendo desenvolvidos com o intuito de identificar e seqüenciar essas proteínas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v. 8, p. 93-99, 1987.
- BONETI, J.I.S. & FERRAZ, S. Modificação do método de Hussey e Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 6, n. 3, p.553, 1981.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 680-685, 1976.
- CARNEIRO, R. M. D. G.; TIGANO, M. S.; JORGE, C. S.; TEXEIRA, A. C. O.; CORDEIRO, M. C. Selection and polymorphism of *Pasteuria penetrans* isolates in relation to *Meloidogyne spp.* from coffee. **Nematology**, v. 6 n. 1 p. 37-47, 2004.

HOFMANN, J.; GRUNDLER, F. M. W. Females and males of Root-parasitic cyst nematodes induce Different symplasmic connections between their syncytial feeding cells and the phloem in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 2439, 2006.

JAUBERT, S.; LEDGER, T.N; LAFFAIRE, J. B.; PIOTTE, C.; ABAD, P.; ROSSO, M. N. Direct Identification of Styel Secreted Proteins From Root-knot Nematodes by a Proteomic Approach. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.121, p. 205-211, fev. 2002.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of the bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

MURAD, A. M.; LAUMANN, R. A.; LIMA, T. De A.; SARMENTO, R. B.; NORONHA, E. F.; ROCHA, T. L.; VALADARES-INGLIS, M. C.; FRANCO, O. L. Screening of entomopathogenic *Metarhizium anisopliae* isolates and proteomic analysis of secretion synthesized in response to cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*) exoskeleton. **Comparative Biochemistry Physiology part C**, v. 142, n. 3-4, p. 365-70, 2006.

SASSER, J. N.; FRECKMAN, D. W. A World Perspective on Nematology: The role of the society. **Vistas on Nematology**, p. 7-14, 1987.

ANÁLISE PROTEÔMICA DE RAÍZES DE ALGODOEIRO RESISTENTE E SUSCEPTÍVEL INFECTADAS COM *Meloidogyne incognita*

Rocha, T.L.¹; Costa, P.H.A.^{1,2}; Magalhães, J.C.C.¹; Grossi-de-Sá, M.F.¹.

¹EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia; ²UnB - Universidade de Brasília.

thales@cenargen.embrapa.br

RESUMO

Nas últimas décadas, o consumo mundial de algodão tem crescido consideravelmente. Contudo, a produção desta cultura é afetada por grandes perdas causadas por pragas, dentre as quais se destacam os nematóides do gênero *Meloidogyne* spp. Atualmente, há um grande esforço no sentido de se buscar novas alternativas para o controle deste fitopatógeno. Uma estratégia muito promissora é a tecnologia proteômica. Com o objetivo de identificar as proteínas relacionadas ao mecanismo de resistência do algodão, um estudo proteômico comparativo das raízes de genótipos de algodão resistente e susceptível ao nematóide *Meloidogyne incognita* foi realizado. Plantas com aproximadamente dois meses foram infectadas com 20.000 juvenis de segundo estágio (J2) de *M. incognita* e, após 5 e 15 dias, suas raízes foram coletadas. Três diferentes métodos de preparação de amostras protéicas para eletroforese bidimensional foram testados. Os resultados demonstraram a presença de várias proteínas com diferentes níveis de expressão entre os genótipos susceptível e resistente. A análise dos *spots* diferenciais via espectrometria de massa demonstrou a presença de uma quinona reductase 2, enzima ativada em situações de estresse oxidativo.

INTRODUÇÃO

A demanda brasileira e mundial das indústrias têxteis pela fibra do algodão vem crescendo acentuadamente. No entanto, o Brasil passou da condição de um dos maiores exportadores para a situação de um dos países que mais importam este produto agrícola (REETZ *et al.*, 2006). A recuperação da posição de destaque do Brasil na produção mundial de algodão tem sido dificultada por diversos fatores. Um dos principais são as constantes perdas de produção ocasionadas pelo o ataque de pragas. A infecção por fitonematóides pode ser considerada um dos mais importantes estresses abióticos que afetam diversas culturas, e o nematóide da galha (*Meloidogyne incognita*) é a principal espécie que infecta o algodoeiro. Os juvenis de segundo estágio (J2) deste fitopatógeno infectam as raízes, formando pequenas galhas que causam a atrofia geral das plantas. Na parte aérea, um sintoma freqüentemente induzido pelo parasita é a formação do 'carijó' (clorose internerval) nas folhas (SILVA *et al.*, 1997). Esses autores verificaram que a capacidade produtiva do algodoeiro é reduzida significativamente com o aumento do 'carijó', sobretudo quando o sintoma ocorre também nos ponteiros das plantas.

Embora muitos genótipos de algodoeiros resistentes a *M. incognita* tenham sido desenvolvidos nos últimos 30 anos por melhoramento clássico, um alto nível de resistência raramente foi incorporado a cultivares comercialmente viáveis (STARR *et al.*, 2002). Atualmente, há um grande esforço no sentido de se controlar o ataque deste fitopatógeno. Um enfoque muito promissor para atingir esse objetivo é a tecnologia proteômica, na qual a expressão das proteínas pode ser analisada em larga escala. Até hoje, há poucos relatos sobre a análise proteômica radicular de algodoeiro. Tal fato se deve, principalmente, à presença de grandes quantidades de polímeros, como o gossipol, que interferem na separação das proteínas por focalização isoeletrica, assim como a baixa concentração de proteínas presentes em raízes, quando comparadas a outros tecidos da planta – como folha e semente.

Com o objetivo de identificar proteínas relacionadas com os mecanismos de resistência das plantas aos nematóides, um estudo comparativo das raízes de genótipos de algodão susceptível e resistente foi realizado por meio de eletroforese bidimensional (2-DE). As raízes dos dois genótipos foram analisadas nos períodos de 5 e 15 dias após a inoculação de larvas juvenis (J2) de *M. incognita*.

MATERIAL E MÉTODOS

Extração de nematóides e inoculação das plantas

Para a obtenção das larvas de nematóides *M. incognita*, raízes de tomateiro infectadas, apresentando grande número de galhas, foram lavadas com H₂O e trituradas em hipoclorito de sódio 0,5%. O material resultante foi peneirado e os ovos colocados para eclodir. Após a eclosão, as larvas juvenis de segundo estágio (J2) foram centrifugadas durante 5 minutos, a 2.500 × g, coletadas e contadas em câmara de Neubauer (HUSSEY & BARKER, 1973). As plantas de algodão, variedades resistente IAC022190 e susceptível COODETEC 401, com cerca de 30cm de altura e dois meses de idade, cultivadas em sacos plásticos pretos contendo solo autoclavado, foram infectadas com aproximadamente 20.000 J2. As plantas foram mantidas em casa de vegetação e as raízes foram coletadas nos períodos de 5 e 15 dias após a inoculação. Como controles foram usadas plantas da mesma idade não infectadas com

nematóides. As raízes foram rapidamente lavadas com água corrente, congeladas em nitrogênio líquido e maceradas com o uso de almofariz e pistilo.

Extração das proteínas e eletroforese bidimensional

O material vegetal macerado foi homogeneizado em tampão de extração na proporção 1:3 (p/v) sob agitação leve durante 2 horas, a 4° C. Três tampões de extração foram testados: (A) NaH₂PO₄ 50mM pH 7.0, NaCl 20mM, PMSF 2mM, DTT 10mM; (B) Piridina 50mM pH 5.0, SDS 1%, tiourea 20mM; (C) Tris-HCl 40mM pH 7.5, sacarose 250mM, Triton X-100 1%, EDTA 10mM, PMSF e DTT 1mM. Os extratos foram centrifugados a 10.000 × g durante 45 minutos, a 4° C. Os sobrenadantes foram homogeneizados com TCA 10% em acetona gelada e as proteínas foram precipitadas durante a noite, de acordo com o método descrito por DAMERVAL *et al.*, (1986). Para a eletroforese 2-D, as proteínas foram solubilizadas em solução de uréia 7M, tiourea 2M, CHAPS 4%, IPG Buffer 2% e DTT 0,3%. Cerca de 200µg de proteínas foram aplicados em tiras IPG de 18cm, pH 3-10. A focalização isoeétrica foi realizada no sistema Multiphor II (GE Healthcare) e a segunda dimensão no sistema ETTAN DaltSix (GE Healthcare), seguindo as recomendações do fabricante (BERKELMAN & STENSTED, 1998). Após a corrida, os géis 2-DE foram corados com Coomassie Coloidal e digitalizados com resolução de 300 dpi num scanner ScanJet 4100C (HP). As comparações dos géis foram feitas por inspeção visual. Os spots diferenciais foram excisados dos géis, digeridos com tripsina – de acordo com o método descrito por SHEVCHENKO *et al.*, (1996) – e analisados por MALDI-ToF MS/MS.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudos bioquímicos com o algodoeiro são difíceis de serem realizados, principalmente devido à grande presença de gossipol. Com o objetivo de se estabelecer uma metodologia simples e prática para análise proteômica em algodoeiro, foram testados alguns tampões de extração de proteínas. O tampão C, descrito anteriormente, foi o que apresentou melhor resultado, com um maior número de bandas visualizadas em gel SDS-PAGE (dado não mostrado).

Após a escolha do tampão de extração de proteínas, foram realizadas as eletroforeses bidimensionais (2-DE). Para tanto, foi necessária a eliminação de interferentes da focalização isoeétrica, tais como sais, lipídios e carboidratos, de maneira a tornar a extração das proteínas compatível com o método 2-DE. Resultados satisfatórios foram obtidos com o protocolo de precipitação das proteínas com TCA e acetona decrito por DAMERVAL *et al.*, (1986). Os padrões eletroforéticos bidimensionais das plantas infectadas com nematóides foram, então, comparados aos controles (não-infectados) para verificar a presença ou ausência de spots, bem como o aumento ou a diminuição de suas concentrações relativas – as quais representam, em última instância, os níveis de expressão gênica. Como pode ser observado, a maior parte dos spots detectados se concentra na faixa de pH 4.0 a 7.0 e pesos moleculares entre 25 e 70kDa (Figuras 1, 2 e 3). Em geral, foi possível detectar cerca de 150 spots nos géis 2D. Fazendo-se uma comparação dos perfis protéicos 2D entre os dois genótipos, pode-se observar 14 spots diferenciais, ou seja, spots presentes apenas no genótipo resistente ou em maior concentração neste, independentemente da infecção com nematóides, os quais estão indicados com setas nas figuras 1, 2 e 3. Possivelmente, alguns destes spots podem ser proteínas envolvidas no mecanismo constitutivo de resistência deste genótipo. Em relação às plantas controle não infectadas com nematóides, nove proteínas apresentaram um aumento de expressão após cinco dias da infecção e cinco proteínas apresentaram redução da expressão nas raízes da variedade resistente de algodoeiro (Figura 2). Depois de 15 dias da infecção, foram observadas 15 proteínas com expressão aumentada (Figura 3). Para a variedade susceptível, foram observadas, no quinto dia da infecção, nove proteínas com aumento e uma com redução de expressão em relação ao controle (Figura 2). No décimo quinto dia após a infecção, foram observadas 15 proteínas com aumento e três com redução de expressão (Figura 3). Aumentos da expressão protéica em resposta à infecção por J2 podem estar envolvidos com o mecanismo de resistência induzida, no qual diversas proteínas relacionadas à patogênese (proteínas PR), tais como inibidores de proteinases, quitinases e peroxidases, podem estar atuando (FERRY *et al.*, 2004). É possível que a indução dos genes PR ocorra mais precocemente no genótipo resistente, impedindo o desenvolvimento do nematóide após a sua penetração no sistema radicular. Para averiguar a hipótese de que os spots diferenciais estão envolvidos nos mecanismos constitutivos e/ou indutivos de resistência, estes spots foram excisados dos géis e digeridos com tripsina, na tentativa de se identificar as proteínas por MALDI-ToF MS/MS. Entretanto, não foi possível obter espectros de massas com qualidade e intensidades suficientes para o seqüenciamento dos fragmentos trípticos. Apenas um spot, indicado na Figura 1, apresentou este requerimento e foi identificado como uma Quinona Redutase 2 (QR2, EC 1.6.99.2). Foi possível seqüenciar todo o fragmento, que continha 24 resíduos de aminoácidos. A seqüência obtida foi TDAPIITLVELTEADGVLFQFPTR e apresentou 82,6% de identidade com a quinona reductase 2 de *Triticum*

monococcum. Pelo menos dois tipos de quinona redutase estão presentes nas plantas: (1) a “zeta-crystallin-like quinone reductases” (QR1, EC 1.6.5.5), que catalisa a redução univalente das quinonas para radicais semiquinona, e (2) a “DT-diaphorase-like quinone reductases” (QR2), que catalisa a redução divalente das quinonas para hidroquinonas (MANO *et al.*, 2000). Acredita-se que a QR2 seja induzida em situações de estresse oxidativo, oferecendo uma proteção contra a formação de radicais livres.

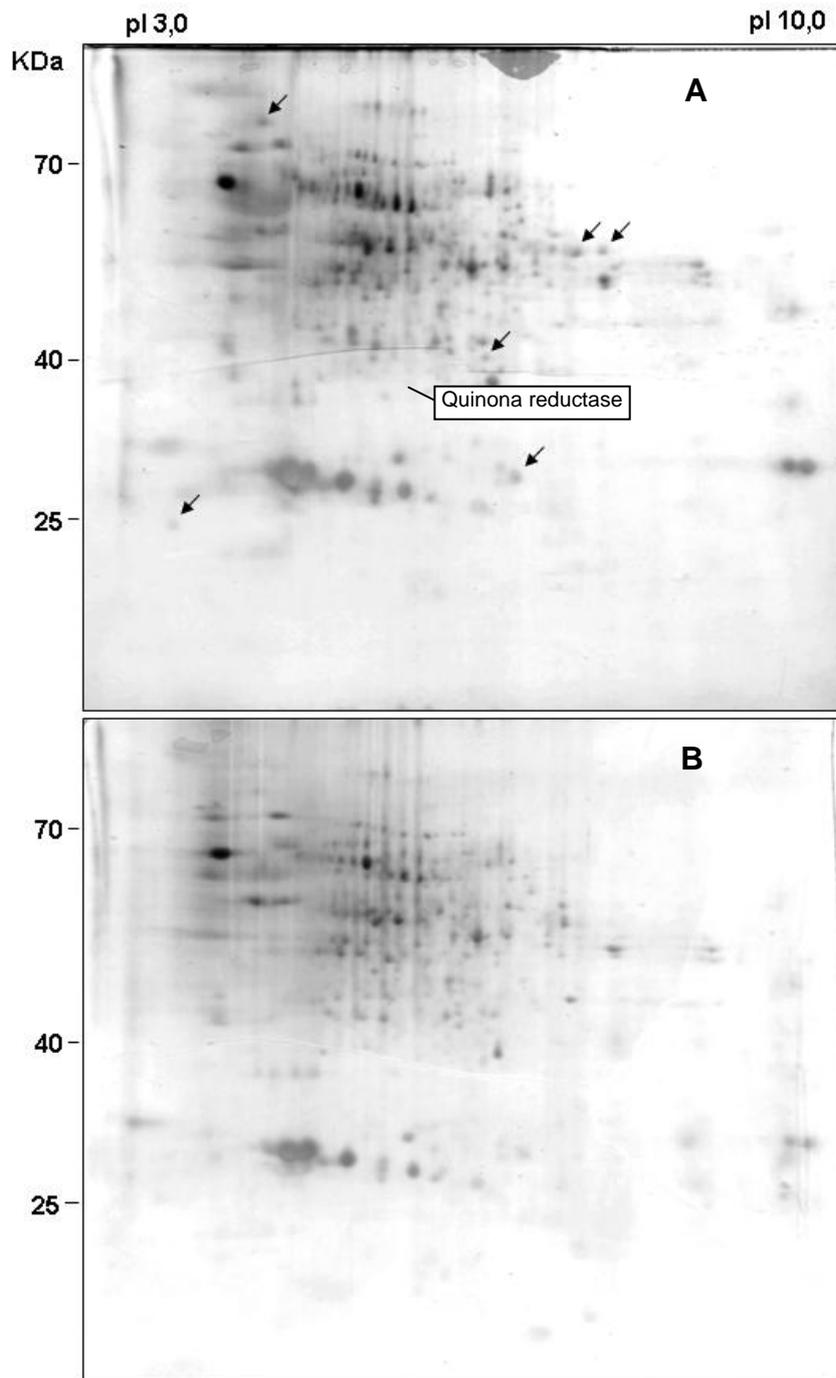


Figura 1. Eletroforese bidimensional de raízes de algodoeiro resistente (A) e susceptível (B) não inoculadas com J2 (Controle). As setas indicam spots diferenciais entre os genótipos resistente e susceptível.

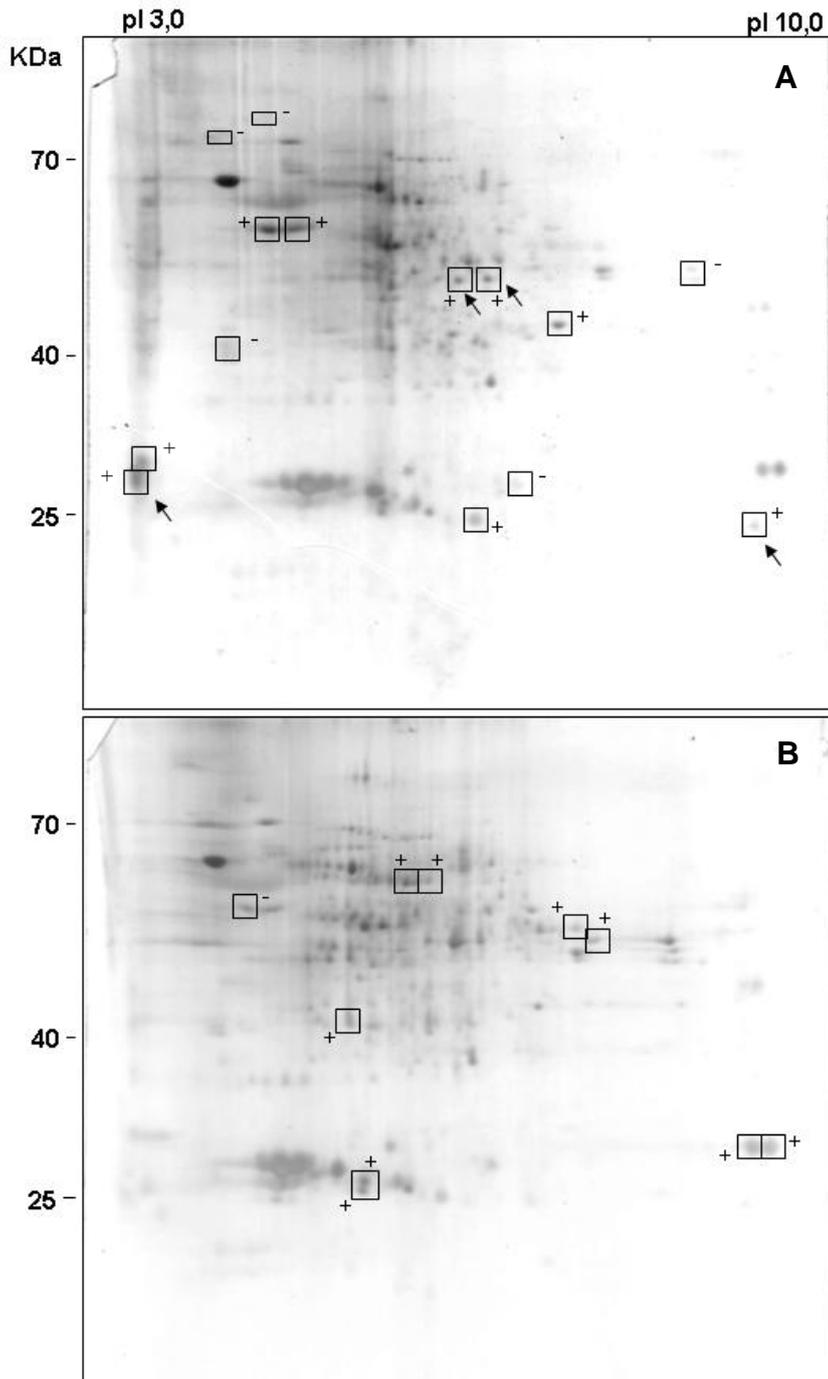


Figura 2. Eletroforese bidimensional de raízes de algodoeiro resistente (A) e susceptível (B) após 5 dias da inoculação de J2. Os quadrados indicam spots com aumento (+) ou diminuição (-) da concentração relativa em comparação ao controle. As setas indicam spots diferenciais entre os genótipos resistente e susceptível.

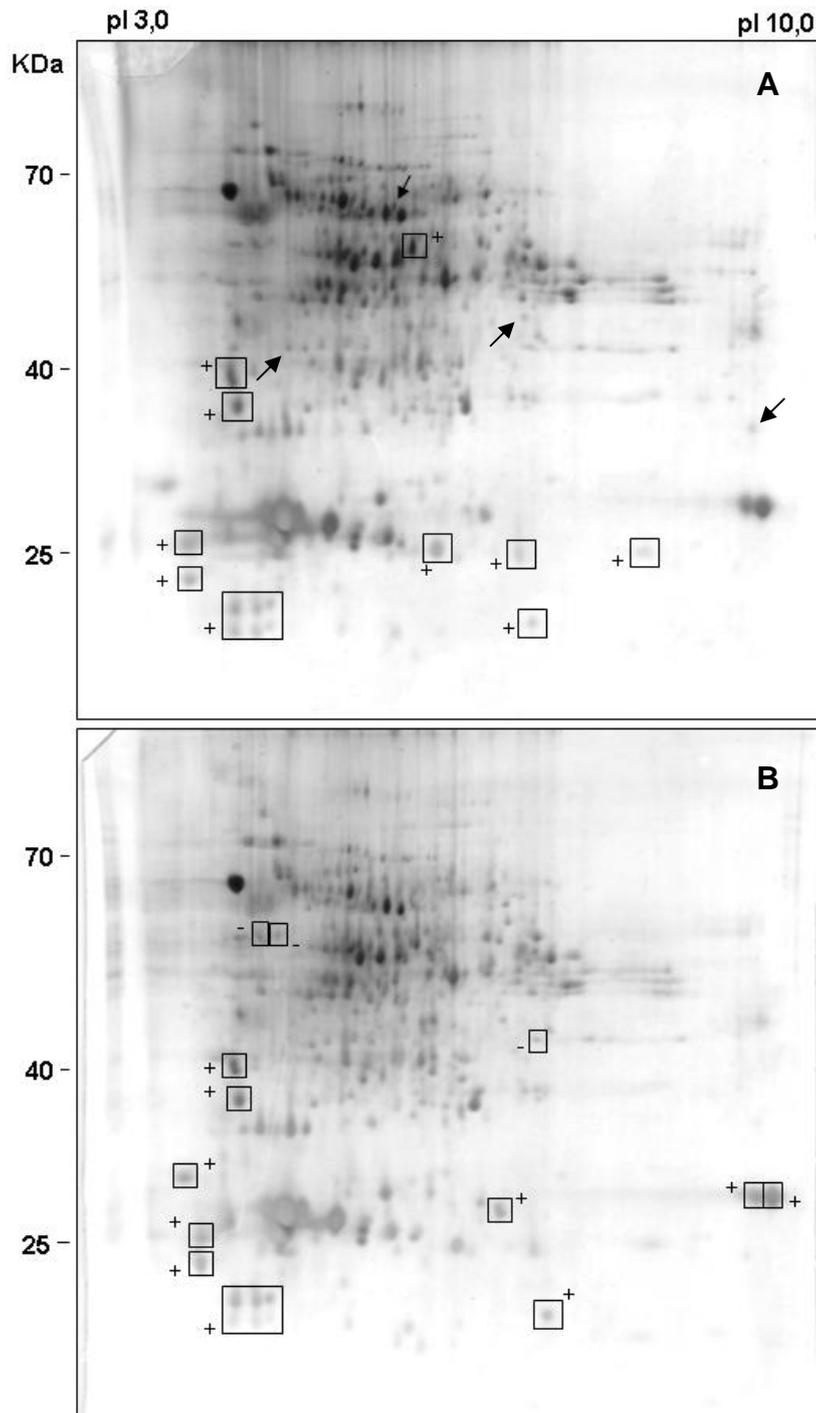


Figura 3. Eletroforese bidimensional de raízes de algodoeiro resistente (A) e susceptível (B) após 15 dias da inoculação de J2. Os quadrados indicam spots com aumento (+) ou diminuição (-) da concentração relativa em comparação ao controle. As setas indicam spots diferenciais entre os genótipos resistente e susceptível.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Apesar da baixa concentração de proteínas presentes nas raízes, este trabalho permitiu o estabelecimento de um protocolo eficiente na preparação de amostras de raízes de algodoeiro para a realização de eletroforese bidimensional. Além disso, a abordagem proteômica se mostrou muito promissora na identificação de novas moléculas de interesse biotecnológico, como as aqui estudadas, que podem servir como ferramentas no desenvolvimento de plantas resistentes a pragas. Melhorias no preparo das amostras para MS estão atualmente sendo realizadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERKELMAN, T.; STENSTED, T. **2-D electrophoresis using immobilized pH gradients: principles and methods**. Edition AC (80-6429-60). Uppsala, Sweden: Amersham Biosciences Inc., 1998. Manual do fabricante. 100 p.
- DAMERVAL, C.; DE VIENNE, D.; ZIVY, M.; THIELLEMENT, H. Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. **Electrophoresis**, v. 7, p. 52-54, 1986.
- FERRY, N.; EDWARDS, M.G.; GATEHOUSE, J.A.; GATEHOUSE, A.M.R. Plant-insect interactions: molecular approaches to insect resistance. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 15, p. 155-161, 2004.
- HUSSEY, R.S.; BARKER, K.R. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. **Plant Disease Report**, v. 57, p. 1025-1028, 1973.
- MANO, J.; BABIYCHUK, E.; HIRATAKE, J.; KIMURA, A.; INZÉ, D.; KUSHNIR, S.; ASADA, K. A novel NADPH: diamide oxidoreductase activity in *Arabidopsis thaliana* P1 ζ -crystallin. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, p. 3661-3671, 2000.
- REETZ, E.; VENCATO, Â.; CORRÊA, S.; RIGON, L.; ROSA, G.R.; RUDOLFO, R.B. Anuário brasileiro do algodão 2006. **Editora Gazeta**, 144p, 2006.
- SHEVCHENKO, A.; WILM, M.; VORM, O.; MANN, M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. **Analytical Chemistry**, v. 68, p. 850-858, 1996.
- SILVA, N.M.; FUZATTO, M.G.; KONDO, J.L.; SABINO, J.C.; PETTINELLI JUNIOR, A.; GALLO, P.B. A adubação nitrogenada e o sintoma de nematóides no algodoeiro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 21, p. 693-697, 1997.
- STARR, J.L.; COOK, R.J.; BRIDGE, J. Plant Resistance to Parasitic Nematodes. **CABI Publishing**, 2002. 256p.

ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E DA EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE SEQÜÊNCIAS POTENCIALMENTE ASSOCIADAS AO MECANISMO DE RESISTÊNCIA DE *Arachis* SILVESTRE A *Meloidogyne arenaria* RAÇA 1

Proite, K.³; Leal-Bertioli, S.C.¹; Bertioli, D.²; Guimarães, P.M.¹

¹EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia; ²UCB – Universidade Católica de Brasília; ³UnB – Universidade de Brasília.

RESUMO

Visando a elucidação do mecanismo de resistência de *Arachis stenosperma* a *Meloidogyne arenaria* raça 1, realizou-se a análise histopatológica comparativa de plantas de amendoim resistentes e susceptíveis infectadas e não infectadas. Além disso, seqüências potencialmente associadas a este mecanismo de resistência foram analisadas por Northern-blot, visando o estudo da expressão diferencial em *A. stenosperma* (resistente) e *A. hypogaea* (susceptível). No ensaio histopatológico, observou-se que, em relação a *A. hypogaea*, o parasita apresentou um atraso no seu ciclo de vida e produziu galhas de menor tamanho em *A. duranensis* (moderadamente resistente). Na espécie mais resistente, *A. stenosperma*, o número de juvenis que penetraram nas raízes foi bem menor e estes não conseguiram estabelecer o sítio de alimentação. Não houve o aparecimento de células gigantes, e sim de necroses celulares neste ponto (HR). Sendo assim, este estudo mostrou que *A. stenosperma* tem um mecanismo de resistência similar à reação de hipersensibilidade na região onde se encontra o nematóide e no estágio de estabelecimento do sítio de alimentação. Concomitantemente, seqüências diferencialmente expressas em raízes inoculadas com *M. arenaria* (ARP- Auxin repressed Protein e CKX- citocinin oxidase) foram analisadas quanto à sua distribuição temporal (considerando os mesmos pontos analisados no teste histopatológico) visando a sua associação com o processo de resistência nesta planta. O aumento (ARP) ou diminuição (CKK) da expressão destas seqüências ocorreu justamente em pontos que, segundo o estudo histopatológico, os J2 estão penetrando nesta espécie e tentando estabelecer o sítio de alimentação. Análises via hibridização *in situ*, utilizando-se estas seqüências como sondas, estão sendo realizadas para que se possa determinar melhor o papel destas na resistência em *A. stenosperma*.

INTRODUÇÃO

O amendoim cultivado, *Arachis hypogaea* L., tem origem na América do Sul e está entre as cinco maiores culturas oleaginosas produzidas no mundo. É hospedeira de quatro espécies de nematóides das galhas: *Meloidogyne arenaria* raça 1 (Neal) Chitwood, *M. hapla* Chitwood e *M. javanica* (Treub) Chitwood, sendo o primeiro o principal causador de perdas na produção de amendoim (KOENNING & BARKER, 1992).

A infecção por nematóides resulta em ferimentos nos tecidos vegetais, particularmente durante a fase de migração, como também durante a fase de estabelecimento e expansão do sítio de alimentação. Todo o processo de infecção causa mudanças dramáticas na estrutura radical da planta, que são conseqüência de mudanças da expressão de genes na raiz hospedeira (WANG, *et al.*, 2003). A transformação das células normais da raiz em estruturas de alimentação inclui modificações morfológicas e fisiológicas complexas (WILLIAMSON & HUSSEY, 1996). A complexidade e o dinamismo deste sistema sugerem que deve haver o envolvimento de vários genes. Alterações na expressão de genes correlacionados com respostas de defesa foram observadas em inúmeras interações planta-nematóide, incluindo extensinas, catalases, ciclinas e fitohormônios (GOVERSE *et al.*, 2000). Sabe-se que, quando atacada pelo nematóide, o metabolismo da planta geralmente apresenta uma mistura de mudanças como respostas de defesa, sejam elas respostas que resultem em resistência ou respostas que resultem em susceptibilidade.

Dentro da espécie *A. hypogaea* não foi encontrada qualquer cultivar ou subespécie resistente a *M. arenaria*. No entanto, a resistência a este nematóide foi encontrada em diversas espécies silvestres de *Arachis*. A resistência a nematóides em plantas é geralmente caracterizada pela impossibilidade do nematóide de produzir sítios de alimentação funcionais nas raízes de plantas hospedeiras, o que impede o desenvolvimento da infecção. Nas infecções em plantas resistentes, ocorre a produção de uma resposta local de hipersensibilidade (HR) e de sinais induzidos na planta que parecem respostas similares induzidas por outros patógenos (SOBCZAK *et al.*, 2005). No entanto, o tempo e a localização das respostas varia bastante, dependendo de cada interação gene de resistência NemR-nematóide. Dentre as espécies silvestres, apenas *A. cardenasii* foi avaliada em relação à resistência a *M. arenaria*, mas a análise cobriu poucos pontos da interação planta-patógeno, não elucidando por completo o processo de resistência nessa espécie. Este trabalho teve como objetivos elucidar os mecanismos de resistência de duas espécies silvestres, *A. stenosperma* (V10309) e *A. duranensis* (K7988) a *M. arenaria*, e correlacioná-los com a expressão de genes previamente selecionados, pela análise *in silico* dos ESTs gerados a partir de bibliotecas de raiz da espécie resistente *A. stenosperma* inoculada com o fitonematóide, nestas mesmas espécies.

MATERIAL E MÉTODOS

Ensaio histopatológico

Foram utilizadas seis plantas de cada espécie, *A. stenosperma* (V10309), *A. duranensis* (K7988) e *A. hypogaea*, var. tatu, com dois meses de idade. Os nematóides *M. arenaria* raça 1 foram multiplicados em tomate e extraídos com 0,5% NaOCl (HUSSEY & BARKER, 1973). Os ovos foram eclodidos em funis de Baerman modificados com 300mL de água filtrada. Os juvenis de segundo estágio (J2) recém-eclodidos foram coletados por centrifugação a partir do terceiro dia de eclosão. As seis plantas de cada espécie foram inoculadas com 10.000 J2/planta. Suas raízes foram coletadas e avaliadas em seis pontos: 03, 09, 16, 32, 48 e 63 dias após a inoculação. Para a realização de cortes finos, as raízes foram fixadas em 2% de Glutaraldeído e 0,05M de cacodilato de sódio, durante 48 horas. Após a fixação, as raízes foram infiltradas em resina *spurr* e coradas com azul de toluidina. Os cortes foram analisados em microscópio óptico (Axiophoto – Zeiss, Germany) em campo claro, para a análise das lâminas e foto documentação. O restante da raiz foi clarificado e corado com fucsina ácida (Byrd, 1983). As raízes que ficaram translúcidas e com os nematóides corados foram observadas numa lupa (Zeiss-Germany). Foram montadas lâminas para foto-documentação em microscópio óptico (Axiophoto – Zeiss Germany).

Análise da expressão gênica

Foram utilizadas doze plantas de cada espécie, *A. stenosperma* (V10309), e *A. hypogaea*, var. tatu, com dois meses de idade. Seis plantas serviram como controle e seis plantas tiveram suas raízes inoculadas com 10.000 juvenis de segundo estágio (J2) de *M. arenaria* por planta. Os dois conjuntos (inoculado e não inoculado) foram coletados nos períodos de 4, 9 e 16 dias após a inoculação. O RNA total foi isolado a partir das raízes não inoculadas e inoculadas das espécies susceptível e resistente, conforme descrito em protocolo comercial (TRIZOL, Invitrogen). Os experimentos de Northern-blot foram desenvolvidos de acordo com o protocolo da membrana nylon Hybond-N (Amersham, Arlington, IL). As membranas foram hibridizadas com os seguintes ESTs diferencialmente expressos: (1) proteína reprimida por auxina (Auxin-Repressed Protein- contig 821), (2) citocinina-oxidase (Cytokinin-oxidase- contig 433). As bandas foram quantificadas e normalizadas por meio de métodos de densitometria, utilizando-se o programa Biolumage Intelligent Quantifier (Intelligent Quantifier, Bio Image Systems, Inc., Jackson, MI, USA). Foi gerado um gráfico com valores arbitrários para esta correção.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ensaio histopatológico

A. duranensis e *A. stenosperma* são duas espécies silvestres de *Arachis* que foram identificadas como espécies susceptível e resistente a *M. arenaria* raça 1, respectivamente. Os dados obtidos nesse estudo confirmaram essa análise e demonstraram como ocorre a evolução do processo de infecção nas duas espécies silvestres, em comparação com a espécie hospedeira *A. hypogaea*. Em *A. duranensis*, observou-se um atraso no ciclo de vida do patógeno em relação a *A. hypogaea* – na qual este ciclo ocorre em cerca de 60 dias –, e o tamanho das galhas foi menor que em *A. hypogaea*. Mesmo assim, em *A. duranensis* o ciclo evoluiu com penetração, estabelecimento do sítio de alimentação e maturação dos ovos. Na espécie resistente *A. stenosperma*, o número de juvenis que penetraram foi bem menor, o que pôde ser comprovado pela dificuldade de encontrá-los em alguns pontos que foram avaliados por meio da coloração com fucsina ácida. Além disso, os juvenis que penetraram, quando alcançaram a região do cilindro central, não conseguiram estabelecer o sítio de alimentação. Como observado aos 16 DAI, ainda havia juvenis nesta região tentando, sem sucesso, estabelecer esse sítio. Não houve aparecimento de células gigantes, e sim de necroses celulares neste ponto (HR) (Figura 2M-P). Na figura 2P, parece ocorrer uma tentativa de formação de células gigantes, pois há uma desestruturação das células na porção anterior do nematóide (seta amarela). Após este ponto, não foi possível a observação de nematóides, nem pela avaliação externa das raízes com a coloração com fucsina ácida, nem pelos cortes finos. Sendo assim, este estudo mostrou que *A. stenosperma* apresenta um mecanismo de resistência similar à reação de hipersensibilidade na região em que se encontra o nematóide e no estágio de estabelecimento do sítio de alimentação.

Análise da expressão gênica

Os genes reprimidos pela auxina (*Auxin-repressed protein* – ARP) e seus papéis no crescimento e desenvolvimento das plantas são relativamente pouco estudados. Os genes ARP têm relações estreitas com genes relacionados com dormência (DRM), e já foi mostrado que estes genes foram induzidos pela ação direta do fitohormônio auxina (ROCHA *et al.*, 2007). Em *A. stenosperma*, observamos que aos 4 DAI a expressão do gene ARP foi induzida (up-regulated) nas raízes inoculadas em comparação com as controles (não inoculadas); depois, pode-se ver que sua expressão diminui aos 9 DAI, igualando-se ao das raízes não inoculadas; finalmente, é aumentada novamente nos dois sistemas aos 16 DAI (Fig. 1). A

expressão de ARP também foi monitorada em raízes de *A. hypogaea*, espécie que é susceptível ao nematóide, e observou-se que a expressão deste gene é reprimida durante a infecção (4 DAI, inoculado); no entanto, este gene é induzido nos pontos subseqüentes (9 DAI e 16 DAI, inoculado) (Figura 1).

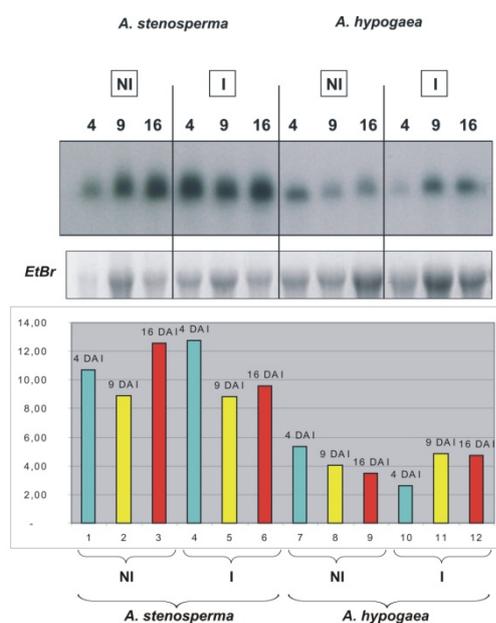


Figura 1- Time-course da expressão do gene ARP em raízes de *A. stenosperma* e *A. hypogaea* não inoculadas e inoculadas com *M. arenaria* raça 1. Os pontos avaliados foram 4, 9 e 16 dias após inoculação (DAI). NI = Não inoculada; I = Inoculada. O gráfico é o resultado da normalização das bandas da hibridização com as bandas coradas com brometo de etídeo. Seus valores correspondem à densitometria realizada pelo programa BiImage Intelligent Quantifier.

A enzima citocinina oxidase/desidrogenase (CKK) é responsável pela maioria do catabolismo e inativação do hormônio citocinina em uma reação irreversível e de uma única etapa enzimática. CKX foi um dos genes diferencialmente expressos na análise dos ESTs de bibliotecas de raízes não inoculadas e inoculadas de *A. stenosperma* com nematóide *M. arenaria*. Observou-se que em raízes de *A. stenosperma* inoculadas (4 DAI e 16 DAI) houve uma indução na expressão do gene CKX, comparado às raízes não inoculadas; no entanto, aos 9 DAI, a expressão foi reprimida (Figura 2). Um padrão diferente foi observado nas raízes da espécie susceptível, *A. hypogaea*, na qual a expressão de CKX foi reprimida em todos os pontos observados durante a infecção com nematóide (Figura. 2). Como a infecção com nematóides induz o acúmulo de citocinina no sítio de alimentação (LOHAR *et al.*, 2004), estes resultados demonstram uma resposta de *feedback* negativo, indicando que a própria citocinina induz sua degradação, pelo menos em parte, pela indução da expressão do gene CKX, impedindo, assim, uma ação persistente de citocinina no tecido. Pode-se então correlacionar a indução da expressão de CKX em raízes de *A. stenosperma* inoculadas com nematóide à presença de citocinina no tecido.

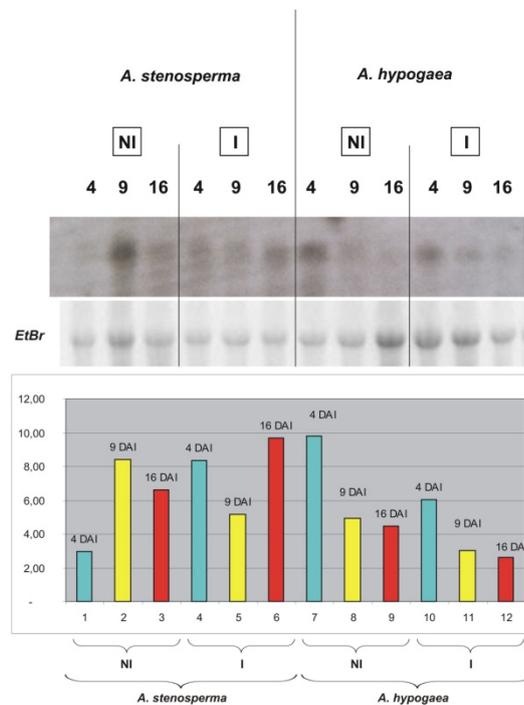


Figura 2 - *Time-course* da expressão do gene CKX em raízes de *A. stenosperma* e *A. hypogaea* não inoculadas e inoculadas com *M. arenaria* raça 1. Os pontos avaliados foram 4, 9 e 16 dias após inoculação (DAI). NI = Não inoculada; I = Inoculada. O gráfico é o resultado da normalização das bandas da hibridização com as bandas coradas com brometo de etídeo. Seus valores correspondem à densitometria realizada pelo programa Bioluminescence Intelligent Quantifier.

PERSPECTIVAS

Espera-se analisar a expressão de outras seqüências diferencialmente expressas por Northern-blot e RT-PCR, e confirmar por experimentos de hibridização *in situ* a função destas seqüências no processo de resistência da planta ao nematóide.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- GOVERSE, A.; DE ALMEIDA ENGLER, J.; VERHEES, J.; VAN DER KROL, S.; HELDER, J.H. E GHEYSEN, G. Cell cycle activation by plant parasitic nematodes. **Plant Molecular Biology** v.5, n.6, p.747-61, 2000.
- HOLBROOK, C.C.; NOE, J.P. Resistance to *Meloidogyne arenaria* in *Arachis* sp. and implications on development of resistant peanut cultivars. **Peanut Science**. v.17, p.35-38, 1990
- HUSSEY, R.S.; BARKER, K.R. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. **Plant Dis. Rep.** 57:1025-1028, 1973.
- KOENNING, S.R.; BARKER, K.R. Relative Damage Functions and Reproductive Potentials of *Meloidogyne arenaria* and *M. hapla* on Peanut. **Journal of Nematology** v.24, n.1, p.187-192, 1992
- LEE, D. J.; PARK, J.Y.; KU, S.J.; HA, Y-M.; KIM, S.; KIM, M.D.; OH, M-H.; KIM, J. Genome-wide expression profiling of ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR 7 (ARR7) overexpression in cytokinin response. **Molecular Genetics and Genomics** v.277, p.115-137, 2007.
- LOHAR, D.P.; SCHAFF, J.E.; LASHEY, J.G.; KIEBER, J.J.; BILYEU, K.D.; BIRD, D.M. (2004) Cytokinins play opposite roles in lateral root formation, and nematode and Rhizobial symbioses. **Plant Journal** v.38, p.203-214, 2004.
- ROCHA, F.R.; PAPINI-TERZI, F.S.; NISHIYAMA, M.Y. JR.; VENCIO, R.Z.; VICENTINI, R.; DUARTE, R.D.; DE ROSA, V.E. JR.; VINAGRE, F.; BARSALOBRES, C.; MEDEIROS, A.H.; RODRIGUES, F.A.; ULIAN, E.C.; ZINGARETTI, S.M.; GALBIATTI, J.A.; ALMEIDA, R.S.; FIGUEIRA, A.V.; HEMERLY, A.S.; SILVA-FILHO, M.C.; MENOSSI, M. E SOUZA, G.M. Signal transduction-related responses to phytohormones and environmental challenges in sugarcane. **BMC Genomics** v.8, n.1, p.71, 2007.
- WANG, J.; POTTER, R.H.; JONES, M.G.K. Differential display analysis of gene expression in the cytoplasm of giant cells induced in tomato roots by *Meloidogyne javanica*. **Molecular Plant Pathology**. v.4, n.5, p. 361-371, 2003.
- WILLIAMSON, V.M.; HUSSEY, H.R. Nematode pathogenesis and resistance in plants. **Plant Cell** v.8, p.1735-1745, 1996.

IDENTIFICAÇÃO DE GENES POTENCIALMENTE ENVOLVIDOS NA RESISTÊNCIA A *Meloidogyne incognita* EM FEIJÃO E ALGODÃO

Santana, C.G.¹; Andrade, A.E.¹; Guimarães, L.M.²; Paes, N.S.¹; Fragoso, R.R.³; da Silva, F.R.¹; de Oliveira, J.T.A.⁴; Carneiro, R.M.D.G.¹ Grossi-de-Sá, M.F.¹; Mehta, A.¹

¹EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia; ²UnB - Universidade de Brasília; ³EMBRAPA Cerrados;

⁴UFC - Universidade Federal do Ceará.

RESUMO

Atualmente, a análise comparativa da expressão gênica tem sido uma importante ferramenta para a interpretação, descrição e predição das funções de genes que se encontram disponíveis nos bancos de dados. Bibliotecas subtrativas de cDNA de genótipos resistente e suscetível de feijão de corda e algodão infectados com *Meloidogyne incognita* foram previamente construídas. Foram obtidos 440 *reads* das bibliotecas de feijão, formando 205 *clusters* e 628 *reads* das bibliotecas de algodão, formando 284 *clusters*. O objetivo deste estudo foi comparar as seqüências de feijão e algodão para buscar mecanismos comuns relacionados à resistência a *M. incognita*. A comparação das seqüências de algodão e feijão revelou 92 *clusters* homólogos entre as duas espécies, dos quais 18 são formados exclusivamente por seqüências oriundas dos genótipos resistentes. A análise destes 18 *clusters* revelou similaridades com proteínas hipotéticas e proteínas relacionadas com a resposta a ferimentos e resistência a insetos e patógenos, incluindo lipoxygenases, cytochrome P450, epóxido hidrolase, entre outras.

INTRODUÇÃO

O nematóide *Meloidogyne incognita* é um parasita que afeta diversas culturas. Sua ação parasitária consiste na infecção do tecido radicular, ação que compromete todo o desenvolvimento da planta. Diversas culturas de grande importância econômica têm sido afetadas por este patógeno dentre estas, pode-se destacar a *Vigna unguiculata* (feijão-de-corda) da indústria alimentícia e o *Gossypium hirsutum* (algodão) da indústria têxtil. Fontes resistentes de ambas as culturas tem sido encontradas em materiais silvestres, mas a utilização dessas fontes tem sido dificultada devido à incompatibilidade genética existente entre os genótipos silvestres e comerciais. Diante dessas dificuldades, técnicas biotecnológicas têm sido desenvolvidas para produzir cultivares de interesse econômico resistentes a este fitopatógeno. Atualmente a análise comparativa da expressão gênica tem sido bastante utilizada para auxiliar este processo, pois esta ferramenta nos permite interpretar, descrever e prever as funções de genes de diversas culturas que se encontram disponíveis nos bancos de dados. Este trabalho teve como objetivo comparar seqüências expressas de feijão e algodão resistente e susceptível à *M. incognita* visando a busca de mecanismos comuns relacionados à resistência ao nematóide.

MATERIAL E MÉTODOS

Cultura de nematóides, extração de ovos e eclosão de juvenis

Neste estudo, foram utilizados nematóides *Meloidogyne incognita* mantidos em tomateiros em casa de vegetação. Para a obtenção dos nematóides, o sistema radicular dos tomateiros foi lavado com água corrente e as raízes foram trituradas em 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. Os juvenis foram então coletados por centrifugação a 2500 x g durante 30 minutos e contados para a infestação de plantas de feijão e algodão.

Infestação das plantas e coletas das raízes infectadas

Cada planta de feijão e algodão foi infectada com aproximadamente 1.000 e 4.000 larvas de *M. incognita*, respectivamente. As coletas das raízes infectadas foram realizadas nos períodos de 3, 6 e 9 dias após a infecção.

O material de ambas as culturas foi macerado e submetido à extração de RNA utilizando-se Concert Plant RNA Reagent (Invitrogen) e a construção das bibliotecas de cDNA foi realizada com a utilização do Kit PCR-Select cDNA Subtraction (Clontech). Foram construídas 2 bibliotecas de cada cultura, sendo que para uma, cDNA do genótipo suscetível foi utilizado como driver e na outra, cDNA do genótipo resistente representou o driver. Desta forma, seqüências expressas nos dois genótipos de cada cultura foram obtidas. A visualização dos produtos diferenciais foi realizada em gel de agarose 1%. A clonagem destes fragmentos foi realizada com a utilização do vetor pGem-T-Easy (Promega) e os clones foram seqüenciados. Análise comparativa foi feita através do programa tBlastX, onde as seqüências presentes

no banco de dados do feijão foram comparadas às seqüências do banco de dados do algodão, permitindo a identificação de seqüências homologas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo foi obtido um total de 440 seqüências das bibliotecas de feijão, formando 205 *clusters* e 628 seqüências das bibliotecas de algodão, formando 284 *clusters* (Figura 1).

A análise comparativa das seqüências de ambas as culturas revelaram 92 *clusters* homólogos entre as duas espécies sendo que 18 destes eram exclusivamente formados por seqüências oriundas dos genótipos resistentes (Tabela 1).

Após analisar estes 18 *clusters*, foi observado que algumas proteínas não apresentaram similaridade como proteínas conhecidas presentes nos bancos de dados (no hits) enquanto que outras apresentaram similaridade com proteínas hipotéticas e proteínas relacionadas com a resposta a ferimentos e resistência ao ataque de insetos e patógenos, incluindo lipoxygenases (Silva, 2001), cytochrome P450 (Young-Cheol Kim, 2006), epoxide hydrolase (Ailan Guo, 1998), entre outras (Tabela 1). É possível que as proteínas de função desconhecida tenham um papel fundamental na resistência da planta à infecção por *M. incognita*. Um total de 12 *clusters* foram formados por seqüências provenientes apenas de genótipos susceptíveis. A maior parte destes *clusters* mostrou similaridade com proteínas de função desconhecida (Tabela 1), que podem ser importantes para os processos de defesa da planta.

Tabela 1. Genes diferencialmente expressos em feijão-de-corda e algodão em resposta à infecção por *M. incognita*.

Query (feijão)	Subject (algodao)	% identity	E-value	Blast Hit	Resistente ou Suscetível feijão	Resistente ou Suscetível algodão
Contig6	Contig40	98,08	5,00E-35	emb CAD77119.1 hypothetical protein-transmembrane region and signal peptide prediction [Rhodopirellula baltica SH 1]	R	R
Contig12	RSALG05_H02_b_016.ab1	80,65	2,00E-31	NO HITS	R	R
Contig19	RSALG05_A02_b_005.ab1	97,01	9,00E-41	NO HITS	R	R
Contig29	RSALG01_C06_g_038.ab1	100	2,00E-50	ref XP_930379.1 PREDICTED: similar to myosin IXA isoform 3 [Mus musculus]	R	R
Contig36	Contig70	100	3,00E-41	gb ABA99880.2 expressed protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	R	R
Contig42	RSALG05_B01_b_009.ab1	97,62	1,00E-25	emb CAD45187.1 lipoxygenase 2 [Hordeum vulgare subsp. vulgare] sp	R	R
Contig47	RSALG01_B08_g_061.ab1	95,89	9,00E-44	ref XP_781687.1 PREDICTED: similar to CG15403-PA [Strongylocentrotus purpuratus]	R	R
Contig52	RSALG04_E09_b_067.ab1	97,44	2,00E-21	gb ABG21975.1 Ribulose biphosphate carboxylase small chain A, chloroplast precursor, putative, expressed [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	R	R
RFEJ01_A	RSALG01_E0	95,56	2,00E-27	NO HITS	R	R

06_b_037	5_g_035.ab1					
.ab1						
RFEJ01_B	Contig16	96,05	1,00E-48	gb EAN30937.1 DNA polymerase alpha, putative [Theileria parva]	R	R
01_b_009						
.ab1						
RFEJ01_E	Contig50	100	5,00E-25		R	R
08_b_055						
.ab1				NO HITS		
RFEJ01_G	RSALG02_E0	96,97	2,00E-44	dbj BAA85201.1 putative epoxide hydrolase [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	R	R
01_b_004	6_b_039.ab1					
.ab1						
RFEJ02_C	RSALG05_B0	97,62	5,00E-26	emb CAD45187.1 lipoxygenase 2 [Hordeum vulgare subsp. vulgare]	R	R
02_b_006	1_b_009.ab1					
.ab1						
RFEJ03_E	RSALG04_G0	88,46	6,00E-39	dbj BAD15724.1 putative Mannosyl-oligosaccharide 1,2-alpha-mannosidase IB [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	R	R
07_b_051	7_b_052.ab1					
.ab1						
RFEJ03_F	RSALG05_F0	98,2	9,00E-77	gb AAM65433.1 unknown [Arabidopsis thaliana]	R	R
03_b_027	5_b_043.ab1					
.ab1						
RFEJ03_F	Contig31	96,36	3,00E-34		R	R
08_b_063						
.ab1				NO HITS		
RFEJ03_G	RSALG05_G0	95,45	3,00E-40	gb ABF97993.1 Cytochrome P450 family protein, expressed [Oryza .	R	R
08_b_056	1_b_004.ab1					
.ab1						
RFEJ04_F	Contig18	99,04	4,00E-68	gb AAG00180.1 phosphoenolpyruvate carboxylase [Oryza sativa]	R	R
03_g_027						
.ab1						
Contig64	Contig104	100	8,00E-46	dbj BAD68299.1 unknown protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	S	S
Contig73	Contig107	100	2,00E-52	gb AAA84370.1 beta-galactosidase alpha polypeptide	S	S
Contig81	SRALG01_G0	97,14	1,00E-22		S	S
	1_g_004.ab1			NO HITS		
SFEJ01_A	SRALG03_A0	76,19	8,00E-29	gb AAN31908.1 unknown protein [Arabidopsis thaliana]	S	S
07_g_049	3_g_017.ab1					
.ab1						
SFEJ01_C	Contig105	77,78	2,00E-34		S	S
10_g_070						
.ab1				NO HITS		
SFEJ02_F	SRALG02_H0	95	3,00E-67	gb AAD42220.2 palmitoyl-acyl carrier protein thioesterase [Elaeis guineensis]	S	S
08_g_063	2_g_016.ab1					
.ab1						
SFEJ02_F	Contig110	75,56	8,00E-30	emb CAB80976.1 hypothetical protein [Arabidopsis thaliana]	S	S
10_g_079						
.ab1						
SFEJ02_H	SRALG01_D0	100	2,00E-24		S	S
07_g_060	4_g_030.ab1					
.ab1				NO HITS		
SFEJ03_C	SRALG01_C0	60	8,00E-20	dbj BAD11647.1 putative glutamate-1-semialdehyde	S	S
04_g_022	3_g_018.ab1					

.ab1				2,1-aminomutase, chloroplast precursor(Glutamate-1- semialdehyde aminotransferase) [Oryza sativa (japonica cultivar- group)]		
SFEJ03_C 04.g_022 .ab1	SRALG01_E1 0.g_071.ab1	95	4,00E-15	dbj BAD11647.1 putative glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase, chloroplast precursor(Glutamate-1- semialdehyde aminotransferase) [Oryza sativa (japonica cultivar- group)]	S	S
SFEJ03_E 08.g_055 .ab1	SRALG01_E0 4.g_023.ab1	88,89	2,00E-14	gb ABF94692.1 expressed protein [Oryza sativa (japonica cultivar- group)]	S	S
SFEJ03_G 02.g_008 .ab1	SRALG01_F0 1.g_011.ab1	73,58	7,00E-24	gb ABG22573.1 auxin- repressed protein-like protein ARP1, putative, expressed [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	S	S

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Silva, M. D. S.; Oliveira, M. G. A.; Lanna, A. C.; Pires, C. V.; Piovesan, N. D.; José, I. C.; Batista, R. B.; Barros, E. G.; Moreira, M. A. 2001. CARACTERIZAÇÃO DA VIA DAS LIPOXIGENASES EM PLANTAS DE SOJA RESISTENTES E SUSCEPTÍVEIS A *DIAPHORTE PHASEOLORUM F.SP. MERIDIONALIS*, AGENTE CAUSAL DO CANCRO-DA-HASTE. Revista Brasileira Fisiologia Vegetal. vol.13 no.3.
- Young-Cheol Kim, Soo-Yong Kim, Kyung-Hee Paek, Doil Choi, Jeong Mee Park. 2006. UPPRESSION OF CACYP1, A NOVEL CYTOCHROME P450 GENE, COMPROMISES THE BASAL PATHOGEN DEFENSE RESPONSE OF PEPPER PLANTS. Biochemical and Biophysical Research Communications vol.345 p. 638-645.
- Guo, A.; Durner, J.; Klessig, D. F. 1998. CHARACTERIZATION OF A TABACCO EPOXIDE HYDROLASE GENE INDUCED DURING THE RESITENCE RESPONSE TO TMV. The Plant Journal. vol. 15. p. 647-656.

Apoio financeiro: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, FAPDF/CNPq

CARACTERIZAÇÃO DE BIBLIOTECAS SUBTRATIVAS DE cDNA DE GENÓTIPOS SUSCEPTÍVEL E RESISTENTE DE ALGODÃO INFECTADOS COM *Meloidogyne incognita*

Caetano, P.¹; Paes, N.S.²; Sales, R.M.O.B.³; da Silva, F.R.²; Carneiro, R.M.D.G.²; Grossi-de-Sá, M.F.²; Mehta, A.²

¹FTB, Brasília-DF, CEP: 72610-300; ²EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF, CEP 70770-900; ³UniCEUB, Brasília-DF, CEP: 70790-075.

amehta@cenargen.embrapa.br

RESUMO

A produção de algodão herbáceo (*Gossypium hirsutum*) no Brasil é de grande expressão socioeconômica para os setores primário e secundário. Entretanto, as pragas e doenças, incluindo a infecção pelo nematóide de galhas *Meloidogyne incognita*, representam um fator limitante para a sua exploração. O objetivo deste estudo foi construir bibliotecas subtrativas utilizando-se o cDNA de raízes dos genótipos susceptível e resistente de algodão infectados com *M. incognita*. As raízes das plantas foram inoculadas com aproximadamente 5.000 larvas de *M. incognita* e coletadas nos períodos de 3, 6 e 10 dias após a infecção. Bibliotecas subtrativas de cDNA foram construídas e a maioria dos fragmentos diferenciais obtidos apresentou tamanhos de 0.1 a 1.5Kb. Estes fragmentos foram clonados em vetor pGem-T-Easy (Promega) e seqüenciados. Foram obtidas 628 seqüências válidas, que formaram 284 *clusters*. Deste total, 169 *clusters* foram formados por uma única seqüência e o maior *cluster* agrupou 25 seqüências. O *cluster* mais populoso mostrou similaridade com a proteína *RNase S-like protein*, envolvida na defesa contra patógenos. Outros genes envolvidos com a interação planta-patógeno foram identificados, incluindo oxidase, metiltransferase, cisteína-protease e lipoxigenase. Foram também analisados genes expressos apenas no genótipo susceptível, constatando-se que a maioria apresentou similaridade com proteínas de função desconhecida.

INTRODUÇÃO

A produção de algodão herbáceo (*Gossypium hirsutum*) no Brasil se concentra nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e Nordeste, e é de grande expressão socioeconômica para os setores primário e secundário. Entretanto, as pragas e doenças, incluindo a infecção pelo nematóide de galhas *Meloidogyne incognita*, representam um fator limitante para a sua exploração. Esse nematóide é considerado um patógeno muito destrutivo para o algodoeiro, diminuindo a capacidade produtiva da planta. O controle mais racional e econômico desses patógenos é feito pelo uso de cultivares resistentes ou tolerantes, complementado por práticas culturais, como a rotação de culturas e o uso de sementes sadias.

Genes que conferem resistência a nematóides foram identificados em várias espécies de plantas. A maioria desses genes codifica proteínas que carregam um motivo estrutural com uma repetição padrão de 20-30 aminoácidos, chamada de repetição rica em leucina (BERTRAND *et al.*, 2001).

Como os nematóides têm sido um sério problema para a cultura do algodão, há grande interesse em melhorar geneticamente as cultivares, tornando-as mais resistentes à infecção por esses parasitas (ABRÃO & MAZZAFERA, 2000). O objetivo deste estudo foi construir bibliotecas subtrativas utilizando-se o cDNA de raízes dos genótipos susceptível e resistente de algodão infectados com *M. incognita*, para identificar genes envolvidos com a resistência a esse patógeno.

MATERIAL E MÉTODOS

Tomateiros infestados com *M. incognita* e mantidos em casa de vegetação foram utilizados neste estudo (Figura 1). 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 hipoclorito de sódio 0,5% (v/v). 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 úmido colocado sobre uma peneira plástica dentro de um recipiente com água destilada. Após a eclosão, os juvenis foram coletados por centrifugação a 2500 x g, durante 5 minutos, e contados para a infestação de plantas de algodão.

As raízes das plantas foram inoculadas com aproximadamente 5.000 larvas de *M. incognita* (Figura 1). As coletas das raízes infectadas foram realizadas nos períodos de 3, 6 e 10 dias após a infecção. Todas as raízes coletadas receberam o mesmo tratamento para limpeza e conservação.

Foram realizadas extrações de RNA utilizando-se Concert Plant RNA Reagent (Invitrogen) e construção das bibliotecas de cDNA utilizando-se o kit PCR-Select cDNA Subtraction (Clontech). Foram construídas duas bibliotecas, uma com o cDNA da planta susceptível como controle (biblioteca RSALG) e outra com o cDNA da planta resistente como controle (biblioteca SRALG). As seqüências de cDNA diferenciais, obtidas após as etapas de PCR primário e PCR secundário, foram visualizadas em gel de agarose. Estes fragmentos foram clonados em vetor pGem-T-Easy (Promega) e seqüenciados.



Figura 1. Raízes de tomate e de algodão resistente e suscetível, infectados com *M. incognita*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os produtos diferenciais obtidos das bibliotecas RSALG e SRALG variaram de 0,5 a 1,5Kb (Figura 2). Foram obtidas 628 seqüências válidas, sendo que o tamanho mínimo de inserto considerado para análise foi de 30pb (phred > 20). A análise das seqüências revelou 284 *clusters* (Tabela 1) com porcentagem de novidade de 45.22%. Deste total, 169 *clusters* foram formados por uma única seqüência, e o maior *cluster* agrupou 25 seqüências. O *cluster* mais populoso mostrou similaridade com a proteína RNase S-like protein, envolvida na defesa contra patógenos. Outros genes envolvidos com a interação planta-patógeno foram identificados, incluindo oxidase, metiltransferase e cisteína-protease (Resende, 2003) (Tabela 2).

Código	# de Reads	# de Clusters
RSALG	423	164
SRALG	205	168
Todas	628	284

Tabela 1. Número de reads e clusters por biblioteca subtrativa de cDNA de algodão resistente e suscetível.

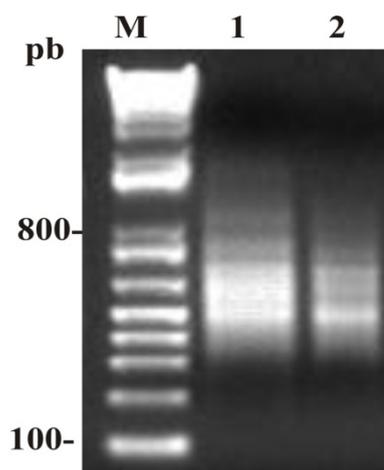


Figura 2. Produtos diferenciais após PCR secundário. 1, RSALG; 2, SRALG; M, ladder 100 pb (Invitrogen).

Tabela 2. Genes possivelmente envolvidos com a resposta de defesa da planta, expressos nos genótipos resistente e/ou suscetível de *G. hirsutum*.

Contig/Read	Proteína codificada	Organismo Homólogo	Número de Acesso
RSALG04_H03_b_028.ab1	respiratory burst oxidase protein	<i>Oryza sativa</i>	AAT35117
Contig 56	putative glycine hydroxymethyltransferase	<i>Oryza sativa</i>	XP_469653
Contig 36	Cysteine protease	<i>Zea mays</i>	CAA68192.1
Contig 101	putative phytochelatin synthetase	<i>Oryza sativa</i>	AAV31332
SRALG01_F01_g_011.ab1	auxin-repressed protein-like protein ARP1, putative, expressed	<i>Oryza sativa</i>	ABG22573
Contig45	putative actin-depolymerizing factor 1 (adf 1)	<i>Oryza sativa</i>	XP_475079
RSALG03_H09_b_076.ab1	enhanced disease resistance	<i>Oryza sativa</i>	AAN61142
SRALG02_F12_g_095.ab1	glyoxalase I	<i>Oryza sativa</i>	XP_480480

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRÃO, M. M.; MAZZAFERA, P. Efeitos do nível de inóculo de *Meloidogyne incógnita* em algodoeiro. *Bragantia*, v. 60, p. 19-26, 2001.
- RESENDE, M. L. V.; SALGADO, S. M. L.; CHAVES, Z. M. Espécies Ativas de Oxigênio na Resposta de Defesa de Plantas a Patógenos. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 28, n. 2, 2003.
- BERTRAND, B.; ANTHONY, F.; LASHERMES, P. Breeding for resistance to *Meloidogyne exigua* in *Coffea arabica* by introgression of resistance genes of *Coffea canephora*. *Plant Pathology*, v. 50, p.637-643, 2001.

SEQÜÊNCIAS DE GENES DE RESISTÊNCIA DA CLASSE 1 E 2 DE *Coffea arabica* RELACIONADAS AO BANCO BRASILEIRO DE ESTs DE CAFÉ.

Albuquerque, E.V.S.¹; Silva, M.S.²; Teixeira, C.C.¹; Martins, N.F.¹; Campos, M.A.³ and Grossi-de-Sá, M.F.¹
¹EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia; ²EMBRAPA Cerrados; ³UFL - Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG.erikavsa@cenargen.embrapa.br

RESUMO

O café é um produto agrícola tradicional da economia brasileira que corresponde a 2.4% do valor total de exportações e gera 8 milhões de empregos. O Brasil produz 40% do café comercializado no mercado internacional e é o segundo maior consumidor de café mundial. Devido a isso, há um aumento de interesse em programas de melhoramento genético para o desenvolvimento de variedades de *Coffea arabica* com maior resistência a nematóides, pestes e doenças. Um grande número de genes de resistência de plantas (genes de R) já foram isolados e classificados em seis categorias denominadas classe 1 e classe 6. A maioria dos genes R pertence à classe 2 e contém um sítio de ligação ao nucleotídeo (NBS - *nucleotide binding site*) e uma repetição rica em leucina (LRR - *leucine-rich repeat*). A Classe 1 inclui os genes R homólogos ao gene *pto* que é o membro tipo da classe 1. Seqüências bem descritas (âncoras) que pertencem à classe 1 e 2 de genes R foram usadas para rastrear o banco de ESTs do Genoma Brasileiro de Café (CafEST) quanto às seqüências de *C. arabica* relacionadas a genes R da classe 1 e 2. As seqüências selecionadas foram agrupadas em *contigs* e *singlets* e comparadas ao banco de dados do NCBI para conferir sua similaridade a genes R conhecidos. As regiões codantes (ORFs - *open reading frames*) dos *contigs* foram analisadas por multi-alinhamento e exibidos em formato de dendograma. Os dendogramas obtidos indicam que um alto número de seqüências de *C. arabica* de ambas as classes 1 e 2 de genes R foram encontradas no banco de dados do CafEST e que os âncoras usados são consideravelmente homólogos aos *contigs* gerados. Este estudo ajudará na identificação de sondas para a correlação de marcadores genéticos em linhagens resistentes de café e para isolamento de seqüências completas de genes R de *C. arabica*.

INTRODUÇÃO

O café é um arbusto lenhoso da família *Rubiaceae* com um ciclo biológico longo. Entre mais de 80 espécies do subgênero *Coffea* estudado até hoje, *C. arabica* é a espécie mais cultivada comercialmente. Embora *C. arabica* corresponda a 70% do mercado de café, ela é altamente susceptível a nematóides, pestes e doenças. Além disso, as características de alotetraploidia e de autogamia de *C. arabica* impedem seu cruzamento com outras espécies que são diplóides e normalmente alógamas. Análises moleculares do genoma de *C. arabica* indicaram uma especiação relativamente recente e cultivares de *C. arabica* introduzidas no mundo todo apresentam uma base genética estreita. Porém, estudos recentes estão revelando que existe certo polimorfismo que pode ser usado para desenvolver marcadores moleculares para programas de melhoramento.

Um grande número de genes de resistência de planta (genes R) já foram isolados e classificados em seis categorias denominadas classe 1 - classe 6. A maioria dos genes R pertencem à classe 2 e contém um sítio de ligação ao nucleotídeo (NBS - *nucleotide binding site*), uma repetição rica em leucina (LRR - *leucine rich repeat*), um N-terminal com um putativo zíper de leucina (LZ - *leucine zíper*) ou uma seqüência *coiled-coil* (CC). A Classe 1 inclui os genes R homólogo ao gene R *pto* de tomate que tem uma região catalítica quinase do tipo serina/reonina e um motivo de miristilação no N terminal (Martin, *et al.*, 2003). Neste estudo, descrevemos a identificação de seqüências do banco de dados do cafEST com similaridade a genes R das classes 1 e 2 expressas por *C. arabica* em diferentes condições experimentais. Os motivos conservados NBS e LRR estão relacionados a fatores de proteção da planta contra muitos patógenos (Williamson, 1999). Análise destas seqüências proverá dados importantes sobre o mecanismo de resistência de café. As seqüências isoladas serão usadas no desenvolvimento de marcadores moleculares para o melhoramento assistido poderiam ser usadas para o isolamento de genes de R para gerar plantas resistentes através de transformação genética.

MATERIAL E MÉTODOS

Seqüências de *C. arabica* relacionadas a genes R da classe 1 e 2 foram procuradas no banco de dados do cafEST (<http://cafe.lge.ibi.unicamp.br/>) usando-se como âncoras seqüências bem descritas de genes R pertencentes à classe 1 e 2. A seqüência do gene Pto (gi | 557882) de *Lycopersicon pimpinellifolium* foi usado como seqüência âncora de gene R classe 1. As seguintes seqüências âncoras, que representam as subclasses de genes R da classe 2, foram usadas para rastrear o banco de dados de cafEST: Bs2 (gi | 6456755) de *Capsicum chacoense*; Dm3 (gi | 4106975) de *Lactuca sativa*; Gpa2 (gi | 6164969) de

Solanum tuberosum; Hero (gi | 26190258) de *Lycopersicon esculentum*; HRT (gi | 7110565) de *Arabidopsis thaliana*; I2 (gi | 4689223) de *L. esculentum*; Mi1.1 (gi | 3449378) de *L. esculentum*; Mi1.2 (gi | 3449380) de *L. esculentum*; Pib (gi | 37777009) *Oryza sativa*; Pi-ta (gi | 12642090) de *O. sativa*; R1 (gi | 17432423) de *Solanum demissum*; RP1 (gi | 5702196) de *Zea mays*; RPM1 (gi | 963017) de *A. thaliana*; Rpp8 (gi | 29839585) de *A. thaliana*; Rpp13 (gi | 7229451) de *A. thaliana*; Rps2 (gi | 15236112) de *A. thaliana* e Rps5 (gi | 3309619) de *A. thaliana*. As seqüências encontradas neste rastreamento foram agrupadas em *contigs* e *singlets* e comparadas ao banco de dados do NCBI para conferir a sua homologia a genes R conhecidos. Os programas *ORF finder* (NCBI) e ferramenta *BLAST* (Altschul et al. 1997) foram usados para a obtenção das seqüências de aminoácido de regiões codificantes putativas dos *contigs* de café. As fases de leitura correspondentes aos *contigs* relacionados às seqüências de genes R classe 1 e 2 e das âncoras usadas no rastreamento do banco de dados de cafEST foram analisados por multi-alinhamento e visualizados em formato de dendograma, usando a ferramenta ClustalW.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A procura de seqüências relacionadas a genes R da classe 1 e classe 2 dentro do banco de dados cafEST resultou em 524 seqüências similares aos genes R de classe 1 e 519 aos de classe 2. O agrupamento das seqüências foi feito para cada classe separadamente usando seqüências com *e-value* menor que 1×10^{-4} . O agrupamento das seqüências resultou em um total de 118 *contigs* e 144 *singlets* de *C. arabica* relacionadas a genes R classe 1, enquanto 97 *contigs* e 121 *singlets* foram obtidos para genes R classe 2. A única seqüência âncora de *Pto* usada para rastrear o banco de dados cafEST recuperou um número considerável de seqüências de *C. arabica* relacionadas a genes R classe 1 com seqüências longas apresentando alta homologia à seqüência de *Pto*, como indica o dendograma na Figura 1. O alinhamento de seqüências relacionadas aos genes R da classe 2 encontradas dentro do cafEST, formou o dendograma da Figura 2, mostrando que o banco de dados cafEST possui seqüências que representam genes R de todas as subclasses da classe 2 Bs2, Dm3, Gpa2, Hero, HRT, I2, Mi1.1, Mi1.2, Pib, Pi-ta, R1, RPM1, Rpp8, Rpp13, Rps2, e Rps5.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Neste trabalho é descrita a análise do rastreamento do banco de dados cafEST para seqüências relacionadas a genes R classe 1 e classe 2 e as análises de alinhamento, apresentada em forma de dendograma, da homologia das seqüências de aminoácidos deduzidas com outras seqüências de aminoácidos de genes R classe 1 e 2 bem estudadas. Foi demonstrado que o banco de dados cafEST representa abundantemente seqüências de genes R classe 1 e classe 2. Além disso, por uma análise mais cuidadosa dos dendogramas gerados, nosso grupo pretende desenvolver marcadores moleculares para resistência de planta para ajudar em programas de melhoramento com seleção assistida. Os dados aqui apresentados são fundamentais para o futuro isolamento de seqüências codificantes completas de genes R de *C. arabica* que possam usadas na geração de plantas transgênicas resistentes. As análises da composição dos *contigs* e de expressão *in silico* das seqüências nos indicarão quais os genes envolvidos nos mecanismos de resistência do café.

REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; 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.
- MARTIN G.B.; BOGDANOVA A.J.; SESSA G. Understanding the functions of plant disease resistance proteins. **Annual Review of Plant Biology**, v. 54, p. 23-61, 2003.
- WILLIAMSON, V. M. Plant nematode resistance genes. **Current Opinion in Plant Biology**, v.2, p.327-331, 1999.

AGRADECIMENTOS

Especial agradecimento dos autores pelo suporte recebido da *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*, *Embrapa Café* e *Consórcio Brasileiro de Pesquisa dos Cafés do Brasil*.

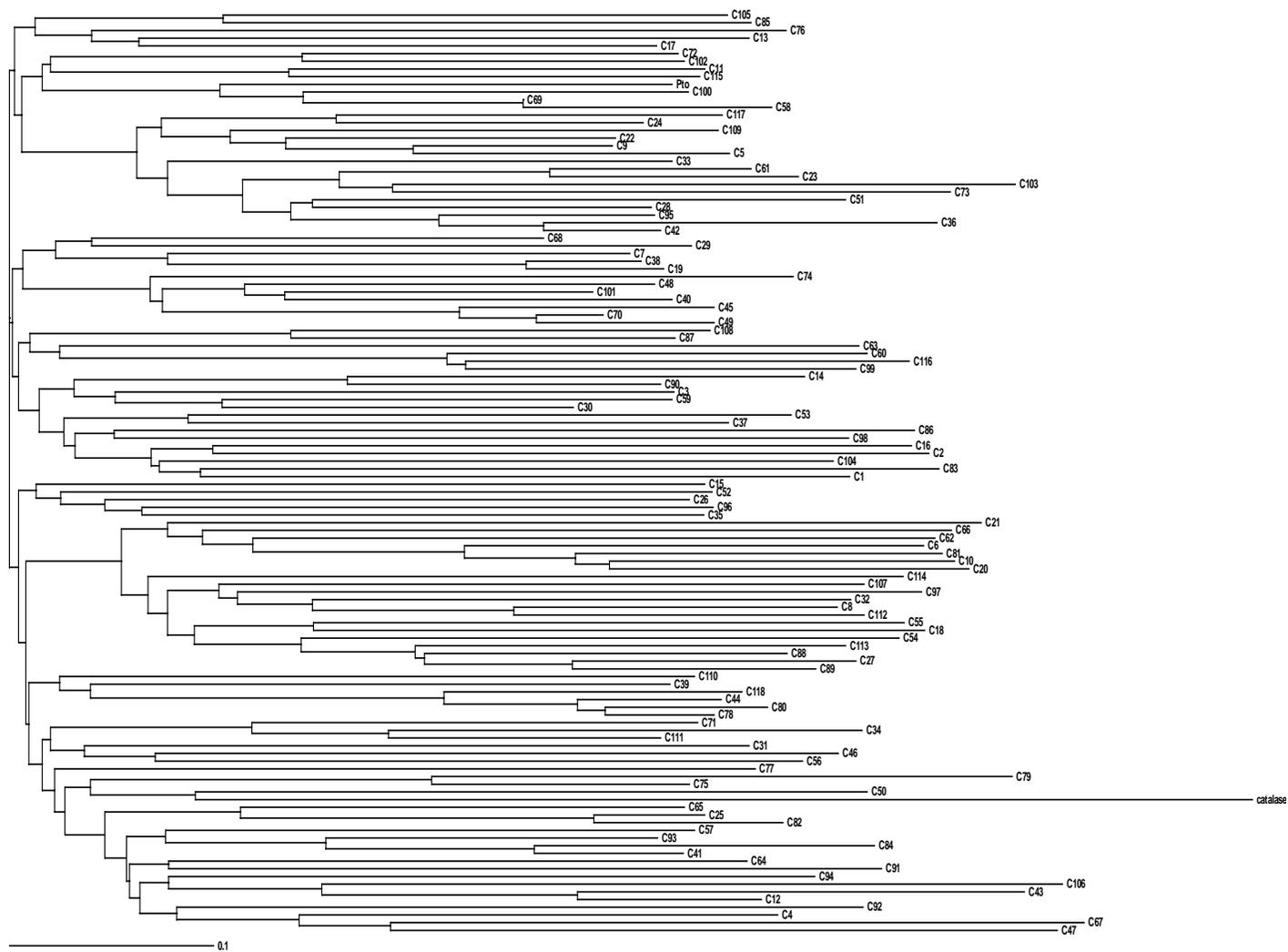


Figura 1. Dendrograma mostrando o alinhamento de seqüências de aminoácidos de genes R classe 1. Seqüências analisadas incluem *contigs* de *C. arabica* do banco de dados cafEST (indicadas por C seguido de um número), uma seqüência âncora usada para rastrear o banco de dados cafEST database (denominado Pto) e uma seqüência não relacionada a genes de café (catalase).

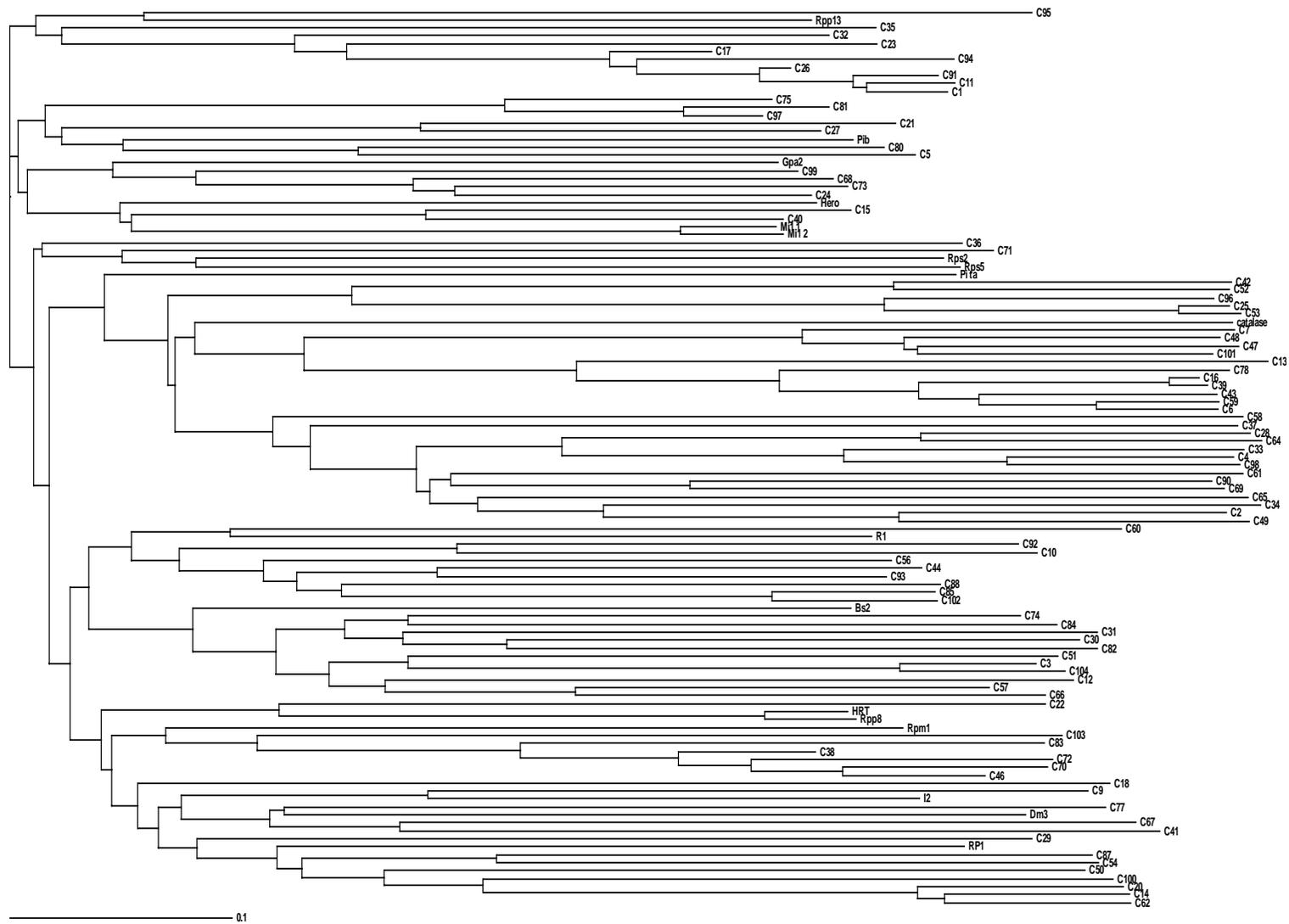


Figura 2. Dendrograma mostrando o alinhamento de seqüências de aminoácidos de genes R classe 2. Seqüências analisadas incluem *contigs* de *C. arabica* do banco de dados cafEST (indicado com C seguido por um número) e seqüências âncoras usadas para rastrear o banco de dados cafEST (indicados como Bs2, Dm3, Gpa2, Hero, HRT, I2, Mi1.1, Mi1.2, Pib, Pi-ta, R1, RP1, RPM1, Rpp8, Rpp13, Rps2, and Rps5).

ANÁLISE *in silico* DOS ESTs ISOLADOS DE *Coffea arabica* INFESTADA COM *Meloidogyne paranaensis* Albuquerque, E.V.S.¹; Silva, M.S.²; Teixeira, C.C.¹; Campos, M.A.³; Grossi-de-Sá, M.F.¹; da Silva, F.R.¹

¹EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, ²EMBRAPA Cerrados, Planaltina-DF, ³UFL - Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG.
erikavsa@cenargen.embrapa.br

RESUMO

O ataque dos nematóides constitui um grande problema fitossanitário para a cultura do café, pelos grandes prejuízos que causam e pela dificuldade de controle. Entretanto, é difícil o melhoramento de *C. arabica* para a introgressão de fontes de resistência caracterizadas em *C. canephora*. A base do conhecimento da genética funcional do cafeeiro recebeu grande aporte de informações pela implementação do Projeto Genoma Café Brasileiro (CafEST), cujo banco de dados reuniu seqüências expressas em diferentes tecidos e tratamentos em *C. arabica*, *C. canephora* e *C. racemosa*. Foram gerados mais de 30 mil unigenes, a partir de 154.770 *reads* presentes nas bibliotecas do CafEST. Entretanto, apenas 6.483 *reads* são oriundos de raiz, sendo que a maior parte destes (76%) provém de uma biblioteca de estresse abiótico. Apenas 302 *reads*, que na sua maioria são *singlets*, correspondem à biblioteca desafiada com nematóide (NS1), em uma condição de interação compatível com cafeeiro susceptível. Neste trabalho, foram feitas análises da biblioteca NS1 no contexto do CafEST com o auxílio das ferramentas desenvolvidas no Laboratório de Bioinformática da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. A busca por seqüências específicas de NS1 gerou uma lista de 60 *clusters* (2 contigs e 58 *singlets*), que foram categorizados de acordo a similaridade com o banco de dados não redundante do National Center for Biotechnology Information (NCBI). Os resultados de BlastX indicaram que metade dos *clusters* não está presente no banco (*no hits*), 40% tem origem vegetal e 10% são de microrganismos ou animais. A comparação da biblioteca NS1 com o restante das bibliotecas do CafEST, assim como com duas outras bibliotecas de raiz induzidas por estresse abiótico (bion e alumínio) demonstrou não haver expressão significativamente diferente pelo teste de Fisher. Como a biblioteca NS1 possui alto índice de novidade (94.7%) e pequeno agrupamento dos *reads*, pudemos inferir que mais bibliotecas de raiz em situações contrastantes devam ser geradas, principalmente de genótipos de café resistente e suscetível aos nematóides. Apesar das limitações da biblioteca, foram encontradas seqüências compatíveis ao estresse aplicado. O entendimento da relação com os patógenos e dos mecanismos da resistência do cafeeiro são ainda bastante incipientes, especialmente em relação aos nematóides. Assim, este estudo faz parte da proposta de alguns projetos em execução que utilizam técnicas moleculares como abordagem da interação entre o *Meloidogyne* e o cafeeiro. Com o entendimento dos mecanismos de resposta da planta envolvidos nesta interação, serão isoladas seqüências que possam ser utilizadas para o melhoramento de cultivares e possibilitar a conseqüente obtenção de plantas resistentes.

INTRODUÇÃO

O café é um tradicional produto do agronegócio brasileiro que corresponde a 2,4% do total das exportações brasileiras (Ministério do Desenvolvimento, 2006). A produção nacional da safra 2006/07 atingiu 42,5 milhões de sacas de 60kg de café beneficiado, sendo 33,0 milhões de *Coffea arabica*. Entretanto, a maior dificuldade da cultura cafeeira é a suscetibilidade dessa espécie ao dano causado por doenças (Carvalho e Chaulfoun, 2000), pragas (Souza e Reis 1997; Souza *et al.*, 1998) e nematóides (Carneiro *et al.*, 2005).

De acordo com dados de Lordello (1976), dentre os nematóides da cultura do café, os do gênero *Meloidogyne spp.* (nematóides de galha) são os mais agressivos. Ao estabelecerem seu sítio de alimentação na raiz de cultivares suscetíveis, os nematóides induzem o tecido adjacente a formar células gigantes, que servem como fonte de nutrientes para o desenvolvimento e reprodução deste parasita (Williamson, 1998). Os danos ao cafeeiro desestabilizam seu metabolismo, o que também pode acarretar suscetibilidade a outros patógenos oportunistas. Entretanto, existe dificuldade dos programas de melhoramento na introgressão em *C. arabica* das fontes de resistência aos nematóides, disponíveis em outras espécies do gênero *Coffea*. Desta forma, é importante a criação de novas cultivares melhoradas quanto à resistência aos nematóides para evitar o uso de controles químicos (McDowell & Woffenden, 2003).

A resposta de defesa na planta pode ser induzida pela interação gene-a-gene do hospedeiro (gene R) com o patógeno (gene Avr), cujo principal efeito é a morte celular programada das células infectadas, isto é, a HR, resposta de hipersensibilidade (Hammond-Kosack & Jones, 1997). Diversos genes de resistência já foram isolados em numerosas espécies de plantas (Martin *et al.*, 2003), sendo que a maioria dos genes R está contida em uma mesma família que apresenta domínio de ligação a nucleotídeos (NBS).

Com o objetivo de caracterizar os genes envolvidos no mecanismo da interação planta/patógeno, foi realizada uma análise da biblioteca de *C. arabica* infectada com *M. paranaensis* (NS1) presente no banco brasileiro de ESTs do Projeto Genoma Café (CafEST). Os 60 *clusters* biblioteca-específicos foram obtidos a partir de 302 *reads*, utilizando-se o conjunto de ferramentas de bioinformática disponível na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. A similaridade desses ESTs com os acessos do GeneBank permitiu a formação de quatro categorias. Os resultados indicam que a biblioteca apresentou alto índice de novidade, sendo que a maioria dos *reads* não formou *contigs*. Entretanto, a comparação da biblioteca NS1 com outras bibliotecas de raiz desafiadas, ou mesmo com o restante do CafEST, não indicou diferença significativa de expressão dos *clusters* específicos da biblioteca testada.

MATERIAL E MÉTODOS

A biblioteca de cDNA NS1 foi construída a partir do conjunto (*pool*) de mRNAs expressos em *Coffea arabica* cv. Catuaí vermelho inoculado com *Meloidogyne paranaensis*. A produção do inóculo de *M. paranaensis* foi feita em plantas suscetíveis de *C. arabica* cv. Mundo novo cultivadas em casa de vegetação. Os ovos foram extraídos de raízes de cafeeiro infestadas utilizando o método de Hussey e Barker (1973), com hipoclorito de sódio 0,5%. Para a eclosão de juvenis de segundo estágio (J2), a suspensão de ovos foi submetida à técnica do funil de Baermann modificado (Whitehead & Hemming, 1965) em recipiente com água destilada durante 14 dias em temperatura de 25-27° C. A suspensão de ovos foi purificada utilizando o método de Flotação e Centrifugação (Jenkins, 1964). Os nematóides no estágio J2 foram quantificados em lâmina de Peters. Plantas com 4 a 6 pares de folhas cultivadas em copos de 200mL com solo foram infestadas com 2000 J2. As raízes secundárias foram coletadas após 3, 6 e 10 dpi, lavadas em água corrente e preservadas a -80° C. A metodologia de extração do RNA total, síntese do cDNA, clonagem e seqüenciamento foram descritas por Vieira *et al.* (2006).

Os dados gerados pelas seqüências da biblioteca NS1 foram analisados no contexto do CafEST utilizando-se o sistema de análise, disponíveis para os usuários cadastrados das instituições participantes deste projeto. Após o processamento dos cromatogramas gerados no Projeto Genoma Café (remoção de seqüências de rRNA e de vetor, adaptador, caudas de poli-A e bases de baixa qualidade), as 154.770 seqüências restantes foram agrupadas com uso do programa CAP3 para a formação de 45.366 grupos do conjunto UniGene de Café. As seqüências-consenso de cada UniGene foram comparadas com seqüências protéicas do NCBI por BlastX. Apenas semelhanças com e-values melhores que 10⁻⁵ foram consideradas. A ferramenta de busca "biblioteca-específica" foi utilizada para o isolamento dos *clusters* presentes somente em NS1. Com o Teste de Fisher, foi realizada a comparação nível de significância 0.5 entre os seguintes grupos: NS1 x CafEST-NS1 e NS1 x raiz desafiada (RT5 e RT8, que receberam estresses abióticos com bion - acibenzolar-S-methyl ou alumínio, respectivamente).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir dos 560 clones seqüenciados da biblioteca NS1, foram gerados 302 *reads* aceitos, que formaram 286 *clusters*. Apenas 14 desses grupos são formados por mais de uma seqüência. Assim, conforme indica o índice de novidade de NS1 (94.7%), se não houvesse comprometimento da qualidade de grande parte das seqüências, outros clones poderiam ter sido seqüenciados antes de atingir o nível de saturação da biblioteca.

Foram obtidos 60 *clusters* com a ferramenta de busca "biblioteca-específica". Apenas dois *contigs* foram formados, cada um contendo 2 *reads*. A análise dos resultados de BlastX desses *clusters* (Fig. 1) demonstrou que 10% dos *clusters* não tem similaridade com outras plantas do banco de dados, sendo 1 deles um *contig*. Como existe a presença de material genético do *Meloydogine*, que é intrínseca ao tratamento para desafio contra nematóide, e uma vez que poucas das seqüências de *Meloydogine* depositadas no banco de dados são anotadas, pode ser que esses *clusters* não constituam contaminação externa do experimento. De acordo com o resultado do BlastX realizado, metade (50%) dos *clusters* não apresentou similaridade com o banco de dados (*no hits found*), que pode indicar novas seqüências isoladas, mas deve-se levar em consideração que apenas 1 desses 30 *clusters* gerados formou *contig*. Além disso, deverão ser analisadas as seqüências nucleotídicas dos *clusters* contra o banco de dados para verificar possíveis semelhanças com genes de microrganismos.

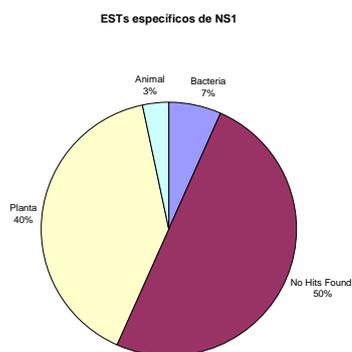


Figura 1: Categorização dos *clusters* biblioteca-específicos de NS1 de acordo com o reino pertencente da seqüência de maior similaridade encontrada no NCBI.

Os resultados de similaridade (*best hits*) dos 40% de ESTs de planta estão representados na tabela 1. Os dados bibliográficos de algumas seqüências identificadas nesta tabela indicam forte ligação das respectivas enzimas com as vias metabólicas relacionadas ao estresse oxidativo.

Tabela1: Resultados dos melhores *hits* de similaridade dos clusters biblioteca-específicos de NS1 a seqüências vegetais depositadas no NCBI.

Cluster	Similaridade	E-value
1	gb AAD50974.1 catalase CAT1 [Manihot esculenta]	3,00E-08
	bj BAD72330.1 putative acyl-CoA synthetase [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	
2		1,00E-100
3	dbj BAE93355.1 phosphate transporter [Lotus japonicus]	1,00E-87
4	dbj BAF17902.1 Os05g0506900 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	2,00E-21
5	dbj BAF25839.1 Os09g0560300 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	7,00E-30
6	emb CAB76908.1 putative Ruv DNA-helicase [Cicer arietinum]	1,00E-119
7	gb AAF61647.1 UDP-glucose:salicylic acid glucosyltransferase [Nicotiana tabacum]	4,00E-75
8	gb AAR83852.1 thioredoxin [Capsicum annuum]	3,00E-44
9	gb AAS88782.1 At1g49000 [Arabidopsis thaliana]	4,00E-17
10	gb AAT40487.1 putative disease resistance protein [Solanum demissum]	1,00E-18
11	gb ABE81653.1 Protein kinase [Medicago truncatula]	2,00E-18
12	gb ABE90455.1 AMP-dependent synthetase and ligase [Medicago truncatula]	1,00E-87
13	gb ABF93805.1 expressed protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	1,00E-21
	ref NP_175266.1 acyl-CoA thioesterase/ catalytic/ hydrolase, acting on ester bonds [Arabidopsis thaliana]	
14		5,00E-14
15	ref NP_175914.1 PLDEPSILON phospholipase D [Arabidopsis thaliana]	1,00E-15
16	ref NP_181959.1 lipid binding [Arabidopsis thaliana]	5,00E-27
17	ref NP_191795.1 unknown protein [Arabidopsis thaliana]	5,00E-92
18	ref NP_564435.1 carbon-sulfur lyase [Arabidopsis thaliana]	1,00E-22
19	ref NP_566232.1 unknown protein [Arabidopsis thaliana]	1,00E-31
20	ref NP_566246.1 nucleotide binding [Arabidopsis thaliana]	9,00E-14
21	gb AAM47987.1 putative protein [Arabidopsis thaliana]	4,00E-12
22	ref NP_849590.1 EMB2748 [Arabidopsis thaliana]	1,00E-19
	ref NP_922201.1 putative steroid membrane binding protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	
23		2,00E-13

Evidências de que o processo oxidativo deve ser evitado para o sucesso da virulência do patógeno foram demonstradas no trabalho de HASSOUNI *et al.*, 1999 com a enzima *peptide methionine sulfoxide reductase* (MsrA), que repara proteínas oxidadas e está presente na maioria dos organismos vivos. Nesse estudo com *Erwinia chrysanthemi*, observou-se que o mutante MsrA2 exibiu virulência reduzida em chicória em comparação ao tipo selvagem. Os autores sugerem que as plantas respondem ao patógeno virulento pela produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), e as enzimas que reparam o dano

oxidativo permitem que os patógenos virulentos sobrevivam ao ambiente da hospedeira. Os resultados dão suporte à teoria de que as ROS desempenham um papel chave na defesa da planta.

A catalase é uma enzima antioxidante que catalisa a conversão do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular, protegendo a célula dos efeitos tóxicos deste poderoso agente oxidante (BAI & CEDERBAUM, 2001). O dano oxidativo é expresso após o desenvolvimento de sintomas na combinação patógeno-hospedeira. O envolvimento das enzimas antioxidantes no desenvolvimento da suscetibilidade sugere que o aumento dessas atividades interrompe os sinais gerados pelo aumento nos reativos de oxigênio (ROS), o que pode enganar as reações de defesa na planta hospedeira, resultando na reação compatível.

A N-miristilação tem funções biológicas diversas e diferentes destinações intracelulares. As quinases e outras proteínas envolvidas na sinalização transmembrânica, como subunidades de proteínas G, são substrato para este tipo de modificação pós-traducional (JEFFREY *et al.*, 1991). Em plantas, a miristilação não é bem conhecida, apesar de ter sido isolado o gene da myristyl CoA: protein N-myristyltransferase de *Arabidopsis thaliana*. A quinase Pto de tomate, que confere resistência à *Pseudomonas syringae*, contém um sítio de miristilação em seu terminal amino. O motivo de miristilação também é encontrado em cDNAs codificadores de acyl-Co-A synthetase graxa de *Brassica napus* e de um gene específico de nódulo de *Alnus glutinosa* (Fulda *et al.* 1997; Pawlowski *et al.* 1997). Entretanto, ainda não foi demonstrada a relação entre estes motivos e suas funções. Recentemente foi descrito que a análise mutacional do sítio de miristilação do Pto não é requerida para conferir a resistência. Transcritos semelhantes a acyl-CoA synthetases foram isolados por *differential display* (DD) de tecidos foliares de pimenta (*Capsicum annuum*) induzidos com ácido salicílico (SA). Um dos transcritos de acyl-CoA synthetase putativa acumulou rapidamente em resposta a tratamento com SA e em interações tanto compatíveis quanto incompatíveis com *Xanthomonas campestris* (Lee *et al.*, 2001).

As peroxiredoxinas são thioredoxin- ou glutaredoxin-dependent peroxidases, cuja função é destruir peróxidos. Foi demonstrado em álamo (*Populus spp.*) que a peroxiredoxin Q, é reduzida por thioredoxin, que serve como doador. Esta atividade da thioredoxin foi evidenciada em mutantes de espinafre (*Spinacia oleracea*). A expressão de peroxiredoxina é modificada em resposta à infecção por *Melampsora larici-populina*, o agente causador da ferrugem do álamo. No caso de resposta de hipersensibilidade (HR), a expressão de peroxiredoxina aumentou, enquanto que na interação compatível houve decréscimo (ROUHIER *et al.*, 2004).

O papel do SA foi estudado em folhas tabaco com interação incompatível causada por patógeno. A biosíntese do SA acumula primariamente como SA 2-O- β -D-glucoside (SAG) e glucosyl salicylate (GS). A SA GTase de tabaco (UDP-glucose:salicylic acid glucosyltransferase) é capaz de formar ambos SAG e GS. Foi demonstrado em bibliotecas de cDNA induzidas por SA a clonagem de um gene com especificidade ampla a fenóis simples. Análise de Northern blot demonstrou que o mRNA de GTase mRNA foi induzido tanto por SA como por patógenos incompatíveis. O rápido tempo de indução do mRNA por SA indica que o transcrito pertence aos genes de resposta precoce ao SA. A indução *in vitro* de Gtase por SA em raiz de aveia (*Avena sativa* L. cv Dal) demonstrou aumento de 23 vezes em relação ao nível constitutivo desta enzima (LEEDAGGER & RASKIN, 1999).

A atividade da phospholipase D (PLD) hidrolisa lipídeos de membrana para gerar ácido fosfatídico (PA) e um grupamento de cabeça livre, sendo esta atividade é amplamente encontrada em vegetais. As PLDs compõem uma família de enzimas heterogênea com propriedades bioquímicas, regulatórias e estruturais distintas. Os mutantes dessa enzima são afetados na morte celular mediada por peróxido. Estudos indicam que a PLD tem um papel multiregulatório em diversos processos, incluindo a sinalização de ácido abscísico (ABA), morte celular programada (PCD), raiz em cabeleira, crescimento de raiz, tolerância ao frio e outras respostas aos estresses. Os resultados indicam que PLDs específicas funcionam em diferentes etapas das vias de estresse oxidativo em plantas: enquanto PLD α 1 promove a produção de ROS, PLD δ media as respostas da planta às ROS (WANG, 2005).

As etapas finais da síntese de ácido jasmônico (JA) é catalizada pelas três principais enzimas do ciclo de β -oxidação: acyl-CoA oxidase (ACX), proteína multifuncional (contendo atividades 2-*trans*-enoyl-CoA hidratase e L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase) e 3-ketoacyl-CoA thiolase (KAT). Presume-se que uma atividade adicional de thioesterase também esteja envolvida na liberação de JA a partir de JA-CoA, o produto final da β -oxidação. A caracterização de um mutante de resposta a ferimento em tomate deficiente na biossíntese de JA biosynthesis demonstrou que este defeito resulta de perda função de um membro (ACX1A) da família de enzimas ACX que participa na β -oxidation peroxisomal. Foi demonstrado que: ACX1A usa OPC8-CoA como substrato e que esta isoforma participa na síntese na vasta maioria dos JA induzidos em folhas feridas; o JA ou um derivado é o sinal fisiológico para a resposta de defesa induzida por ataque de inseto; experimentos de enxertia indicam que o estágio de β -oxidação da biossíntese de JA é requerida para a produção do sinal de ferimento transmissível. Esses

resultados ressaltam a noção de que o JA é um componente essencial do sinal de longa distância para resistência induzida por herbivoria (LI *et al.*, 2005).

As comparações dos clusters específicos de NS1 no nível de significância 0.5 do Teste de Fisher, tanto contra os grupos de raiz desafiada ou do restante do CafEST, indicaram não haver expressão estatisticamente significativa entre as bibliotecas consideradas.

CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Do total de 154.770 *reads* presentes nas 50 bibliotecas do CafEST, apenas 6.483 são oriundos de raiz. A maior parte destes (76%) provém de uma biblioteca de estresse abiótico. Apenas 302 *reads* correspondem à biblioteca desafiada com nematóide, em uma interação compatível com cafeeiro suscetível. Além disso, muitos dos ESTs das bibliotecas de raiz são semelhantes a organismos não vegetais. Apesar das seqüências isoladas de planta serem fortemente relacionadas ao estresse biótico, não foi possível concluir se estes ESTs tem expressão diferencial ou específica desta biblioteca, devido a baixa representatividade dos genes amostrados. Assim, para identificar um conjunto significativo de seqüências de genes relacionados à interação planta-patógeno do cafeeiro com o nematóide, será necessária a construção de novas bibliotecas de raiz, representando o contraste da situação desafiada com nematóide com o controle de raiz não estressada. Com o cruzamento dos dados obtidos pelas abordagens propostas, deveremos obter seqüências potencialmente utilizáveis no estudo de melhoramento do cafeeiro, bem como gerar informações para o entendimento da resistência nesta e em outras culturas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAI J.; EDERBAUM A.I. Mitochondrial catalase and oxidative injury. **Biological Signals and Receptors**, v.10, n. 3-4, p.189-99, 2001.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; RANDIG, O.; ALMEIDA, M.R.A.; GONÇALVES, W. Identificação e Caracterização de Espécies de Meloidogyne em Cafeeiro nos Estados de São Paulo e Minas Gerais Através dos Fenótipos de Esterase e SCAR-Multiplex-PCR. **Nematologia Brasileira**, v. 29, p.233-242, 2005.
- CARVALHO, V.L.; CHAULFOUN, S.M. Doenças do cafeeiro: diagnose e controle **Boletim Técnico** no. 58, Belo Horizonte, MG: EPAMIG, 44 p, 2000.
- FULDA, M.; HEINZ, E.; WOLTER, F.P. *Brassica napus* cDNAs encoding fatty acyl-CoA synthetase. **Plant Molecular Biology**. v.33, 911-922, 1997.
- GORDON J.I.; DURONIO, R.J.; RUDNICK, D.A.; ADAMS S.P.; GOKEL G.W. Protein N-Myristoylation. **Journal of Biological Chemistry** v. 266, n.14 p. 8647-8650, 1991.
- HAMMOND-KOSACK, E.K.; JONES, D.G.J. Plant disease resistance genes. **Plant Molecular Biology**, v. 48, p. 575-607, 1997.
- HASSOUNI, M.E.; CHAMBOST, J.P.; EXPERT, D.; GIJSEGEM, F.V.; BARRAS, F. Biochemistry The minimal gene set member *msrA*, encoding peptide methionine sulfoxide reductase, is a virulence determinant of the plant pathogen *Erwinia chrysanthemi*. **Proceedings of the National Academy of Science, USA** v.96, p. 887-892, 1999.
- HUSSEY, R.S.; BARKER, K.R. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. **Plant Disease Reporter** v. 57, p. 1025-1028, 1973.
- JENKINS, W.R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Reporter**, v.48, p. 692, 1964.
- LEE, S.J.; SUH, M.C.; KIM, S.; KWON, J.K.; KIM, M.; PAEK, K.H.; CHOI, D.; KIM, B.D. Molecular cloning of a novel pathogen-inducible cDNA encoding a putative acyl-CoA synthetase from *Capsicum annuum* L. **Plant Molecular Biology**. v. 46, n. 6, p. 661-671, 2001.
- LEEDAGGER, H.I.; RASKIN, I. Purification, Cloning, and Expression of a Pathogen Inducible UDP-glucose:Salicylic Acid Glucosyltransferase from Tobacco. **Journal Biological Chemistry**, vol. 274, n. 51, p. 36637-36642, 1999.
- LI, C.; SCHILMILLER, A.L.; LIU, G.; LEE, G.I.; JAYANTY, S.; SAGEMAN, C.; VREBALOV, J.; GIOVANNONI, J.J.; YAGI, K.; KOBAYASHI, Y.; HOWE, G.A. Role of β -Oxidation in Jasmonate Biosynthesis and Systemic Wound Signaling in Tomato. **The Plant Cell** v.17, p. 971-986, 2005.
- LORDELLO, L.G. Nematóides das plantas cultivadas. 8ª ed. São Paulo, Brasil, Nobel. 314 p. 1976.
- MARTIN, G.B., BOGDANOVE, A.J. AND SESSA, G. Understanding the functions of plant disease resistance proteins. **Annual Review of Plant Biology**, v. 54, p. 23-61, 2003.
- MCDOWELL, J.M. ;WOFFENDEN, B.J. Plant disease resistance genes: recent insights and potential applications. **Trends in Biotechnology**. v. 21, n.4, 2003.
- MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO. Cadeias que sofreriam menores ameaças com a liberalização. http://www.desenvolvimento.gov.br/arquivo/sdp/proAcao/forCompetitividade/impZonLivComercio/11cafe_resumo.pdf Acesso em: 08 dez. 2006.

PAWLOWSKI K.; TWIGG P.; DOBRITSA S.; GUAN C.; MULLIN B.C. A nodule-specific gene family from *Alnus glutinosa* encodes glycine- and histidine-rich proteins expressed in the early stages of actinorhizal nodule development. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.10, p. 656-664, 1997.

ROUHIER, N.; GELHAYE, E.; GUALBERTO, J.M.; JORDY, M.N.; DE FAY, E.; HIRASAWA, M.; DUPLESSIS, S.; LEMAIRE, S.D.; FREY, P.; MARTIN, F.; MANIERI, W.; KNAFF, D.B.; JACQUOT, J.P. Poplar Peroxiredoxin Q. A Thioredoxin-Linked Chloroplast Antioxidant Functional in Pathogen Defense. **Plant Physiology** v.134, n. 3, p. 1027-1038, 2004.

SOUZA, J.C. DE; REIS, P.R. **Boletim Técnico** no. 50, Broca-do-café: histórico, reconhecimento, biologia, prejuízos, monitoramento e controle. Belo Horizonte, MG: EPAMIG, setembro 1997. 40 p.

SOUZA, J.C. DE; REIS, P.R.; RIGITANO, R.L.O. **Boletim Técnico** no. 54, Bicho-Mineiro do Cafeeiro: biologia, danos e manejo integrado. Belo Horizonte, MG: EPAMIG, maio 1998. 48p.

VIEIRA, L.G.E.; ANDRADE, A.C.; COLOMBO, C.A.; MORAES, A.A.H.; METHA, A.; OLIVEIRA, A.C.; LABATE, C.A.; MARINO, C.L.; MONTEIRO-VITORELLO, C.B.; MONTE, D.C.; GIGLIOTI E.; KIMURA, E.T.; ROMANO, E.; KURAMAE, E.E.; LEMOS, E.G.M.; ALMEIDA, E.R.P.; JORGE, E.C.; BARROS, E.V.S.A.; DA SILVA, F.R.; VINECKY, F.; SAWAZAKI, H.E.; DORRY, H.F.A.; CARRER, H.; ABREU, I.N.; BATISTA, J.A.N.; TEIXEIRA, J.B.; KITAJIMA, J.P.; XAVIER, K.G.; LIMA, L.M.; CAMARGO, L.E.A.; PEREIRA, L.F.P.; COUTINHO, L.L.; LEMOS, M.V.F.; ROMANO, M.R; MACHADO, M.A.; COSTA, M.M.C.; GROSSI DE SÁ, M.F.; GOLDMAN, M.H.S.; FERRO, M.I.T.; TINOCO, M.L.P.; OLIVEIRA, M.C.; SLUYS, M-A.V.; SHIMIZU, M.S.; MALUF, M.P.; EIRA, M.T.S.; GUERREIRO FILHO O.; ARRUDA, P.; MAZZAFERA, P.; MARIANI, P.D.S.C.; OLIVEIRA, R.L.; HARAKAVA, R.; BALBAO, S.F.; TSAI, S.M.; MAURO, S.M.Z.; SANTOS, S.N.; SIQUEIRA, W. J.; COSTA, G.G.L.; FORMIGHIERI, E.F.; CARAZZOLLE, M.F.; PEREIRA, G.A.G Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource. **Brazilian Journal Plant Physiology** v.18, p. 95-108, 2006.

WANG, X. Regulatory Functions of Phospholipase D and Phosphatidic Acid in Plant Growth, Development, and Stress Responses. **Plant Physiology**, v.139, n. 2, p. 566–573, 2005.

WHITEHEAD, A.G.; HEMMING J.R. A comparison of some quantitative methods of extracting small vermiform nematodes from soil. **Annual Applied Biology**, v.55, p.25-38, 1965.

WILLIAMSON, V.M. Root-knot nematode resistance genes in tomato and their potential for future use. **Annual Review Phytopathology**, v. 36, p. 277-293, 1998.

ANÁLISE DE ESTs DE RAÍZES DE GENÓTIPOS DE ALGODÃO CONTRASTANTES COM RESISTÊNCIA E SUSCEPTIBILIDADE AO NEMATÓIDE *Meloidogyne incognita*

Barbosa, A.E.A.D.^{1,2}; Lima, L.M.²; Fragoso, R.R.⁵; Guimarães, L.M.^{1,4}; Souza, D.S.L.⁴; Oliveira Neto, O.B.^{1,6}; Paes, N.¹; Carneiro R.¹; Togawa, R.C.¹; Martins, N.F.¹; Grossi-de-Sá, M.F.^{1,3}

¹EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia; ²EMBRAPA Algodão; ³UCB – Universidade Católica de Brasília; ⁴UnB – Universidade de Brasília; ⁵EMBRAPA Cerrados. ⁶Centro Univeristário Unieuro. aulus@cenargen.embrapa.br

RESUMO

O algodão é uma das *commodities* mais importantes para a economia do Brasil. No entanto, é alvo do ataque de um grande número de pragas, incluindo o nematóide *Meloidogyne incognita*, patógeno considerado de grande importância na cotonicultura. Os fitonematóides atacam as raízes do algodão, causando sérios danos que levam à diminuição da qualidade e da quantidade das fibras produzidas. Este trabalho teve por objetivo utilizar a abordagem de genômica funcional, visando identificar genes em genótipos de algodão com potencial envolvimento com a resistência ao *M. incognita*. As variedades de algodão susceptível (IAC 98/708) e resistente (IAC 96/414) ao *M. incognita* foram inoculadas com 1.200 juvenis de segundo estágio (J2) do nematóide. Foram preparados cDNAs a partir dos mRNAs isolados de um *pool* de raízes, coletadas nos períodos de 2, 4 e 18 dias após a inoculação (d.a.i.). Os ESTs resultantes foram clonados no vetor pSPORT1 (Invitrogen). A qualidade das seqüências foi avaliada com o programa PHRED e o agrupamento foi feito com o programa TGICL do TIGR. Na anotação, utilizaram-se os programas BLASTX 2.2.3, MIPS, KOG.v.1.0, PFAM E SWISSPROT. Foram seqüenciados um total de 2262 ESTs, agrupados em 1827 unigenes, sendo 234 *contigs* e 1593 *singlets*. Observaram-se *contigs* formados exclusivamente com *reads* da planta resistente ou da planta susceptível; ou, ainda, de ambas. Foram identificadas 20 seqüências de genes potencialmente relacionados com resistência a pragas, encontrados unicamente nas raízes de algodão resistente infectadas com o nematóide. Dentre os *contigs* mais populados, encontrou-se similaridade à superóxido dismutase, chaperona HSP90, proteína LRR e isoflavona redutase. A expressão diferencial dos genes identificados está sendo avaliada por PCR em tempo real. Os genes de interesse serão validados em plantas modelo, via engenharia genética de plantas.

INTRODUÇÃO

As perdas mundiais causadas por nematóides parasitas de plantas chegam a valores da ordem de US\$ 100 bilhões/ano (WILLIAMSON & KUMAR, 2006). O grupo dos nematóides da galha, formado pelo gênero *Meloidogyne*, é o mais importante economicamente, e as espécies *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* e *M. hapla* são responsáveis por 95% das infestações deste grupo, atacando mais de 1.700 espécies de plantas, sendo a espécie *M. incognita* a mais importante (HUANG, *et al.*, 2006). Após entrar em contato com a planta hospedeira, os nematóides da galha migram intercelularmente até a zona de diferenciação da raiz. A seguir, formam um sítio de alimentação por meio da indução de sucessivas divisões nucleares sem citocinese nas células da raiz, formando, assim, as chamadas células gigantes. São essas células gigantes que possibilitam a formação das galhas nas raízes das plantas. Tendo induzido o sítio de alimentação, o nematóide ingere o citoplasma das células gigantes por meio do seu estilete, passando a absorver os nutrientes vegetais (WILLIAMSON AND GLEASON, 2003). Tradicionalmente, o controle desta praga se restringe ao uso de práticas de manejo, rotação de culturas, plantas resistentes e aplicação de nematicidas, sendo que este último apresenta uma série de desvantagens, incluindo preço elevado, baixa especificidade e alta toxicidade (CHITWOOD, 2002).

O algodão é uma das culturas agrícolas mais importantes para o Brasil. Entretanto, sua cultura é atacada por uma série de pragas, incluindo os nematóides da galha, cujos danos causados levam a reduções na qualidade e no comprimento das fibras do algodão (SMITH, *et al.*, 1991).

Este trabalho teve como objetivo analisar uma biblioteca de ESTs de raízes de dois genótipos contrastantes de algodão, um resistente e outro susceptível ao ataque do nematóide *Meloidogyne incognita*, visando identificar possíveis genes candidatos envolvidos nos mecanismos de resistência.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal.

Plantas de dois genótipos de algodão (*Gossypium hirsutum* L.), um susceptível (IAC 98/708) e outro resistente (IAC 96/414) ao *M. incognita* foram crescidas durante 30 dias em casa de vegetação.

Posteriormente, as plantas foram inoculadas com 1.200 J2 do *M. incognita* raça 3 e mantidas em casa de vegetação. As raízes foram coletadas nos períodos de 2, 4 e 18 dias após a inoculação, congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80 ° C.

Extração de RNA e síntese de cDNAs.

O RNA total foi extraído das raízes congeladas usando-se o reagente CONCERT (Invitrogen) de acordo com o protocolo do fabricante. Os mRNAs foram purificados utilizando-se o kit Oligotex mRNA (QIAGEN), segundo instruções do fabricante. A síntese de cDNAs foi feita com 4µg de mRNA e clonados no plasmídeo pSORT1.

Clusterização e análise de seqüências.

A análise da qualidade das seqüências foi feita com o programa PHRED (EWING *et al.*, 1998), e a clusterização foi feita com o programa TGICL do TIGR. Foi então realizada uma anotação automática com o programa BLASTX 2.2.3 (ALTSCHUL, *et al.*, 1990) contra o banco de dados do GenBank, do banco MIPS, do banco KOG.v.1.0, e, finalmente, contra o PFAM E SWISSPROT (TATUSOV, *et al.*, 2003; FINN, *et al.*, 2006). Com a disponibilidade destes resultados, os *clusters* foram avaliados por anotadores.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Seqüenciamento e clusterização dos ESTs de raiz de algodão.

Foram seqüenciados um total de 2.262 ESTs, oriundos das plantas com genótipos resistente e susceptível. Estes foram agrupados em 1.827 unigenes, sendo 234 *contigs* e 1.593 *singlets*. Observaram-se *contigs* formados exclusivamente com *reads* da planta resistente ou da planta susceptível, ou de ambas (Figura 1A e 1B).

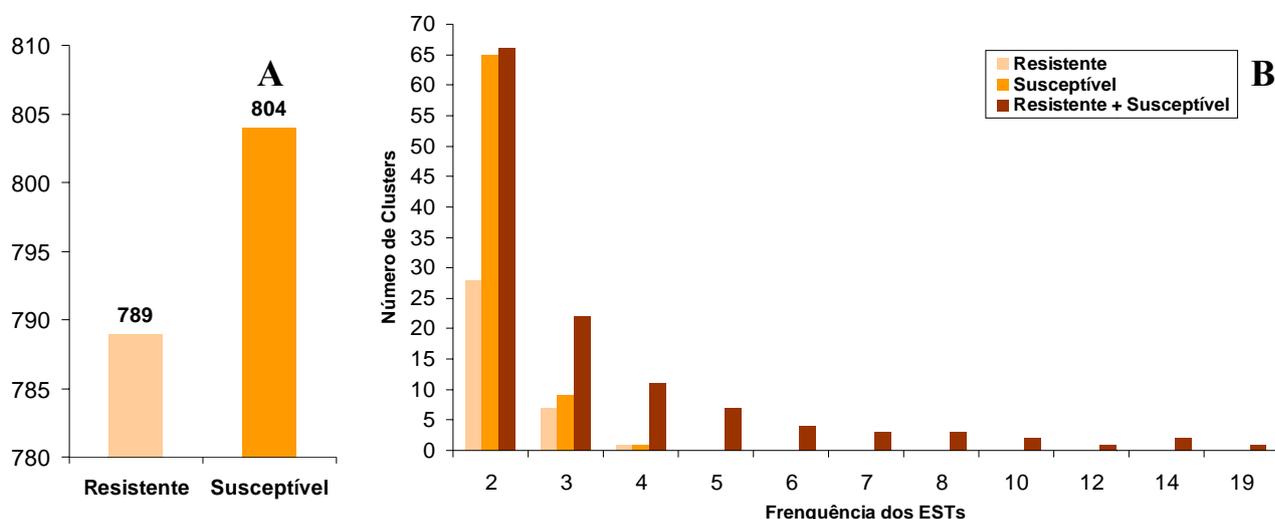


Figura 1. A. Número de singlets que restaram após o agrupamento dos ESTs das plantas de algodão resistente e susceptível. B. Número de clusters por composição (expresso exclusivamente no resistente, expresso exclusivamente no resistente susceptível ou expresso no resistente e no susceptível) e número de reads em cada cluster.

Busca e anotação dos possíveis genes de resistência a nematóide no algodão.

Ao final da anotação, foram encontrados diversos genes relacionados com resistência a patógenos, tanto na planta resistente como na planta susceptível, inclusive com um maior número destes expressos na planta susceptível. No entanto, esta análise se concentrou nos possíveis genes de resistência que se expressaram somente na planta de algodão resistente a *M. incognita* (Tabela 1).

O gene mais populado somente na planta de algodão resistente foi a piruvato descarboxilase. Este gene está envolvido, principalmente, em respostas contra falta de oxigênio. No entanto, já foi observada a sua expressão em resposta contra patógenos (TADEGE, *et al.*, 1999). O segundo gene mais populado foi o fator de iniciação da tradução 5A, que já teve a sua expressão observada em plantas de arroz resistente a bactérias (HAN, *et al.*, 2004). A enzima superóxido dismutase já teve sua expressão observada em várias plantas em resposta a patógenos, como, por exemplo, em tomate (KUŹNIAK & SKŁODOWSKA, 2005). A chaperona HSP90 participa do dobramento das proteínas R que estão envolvidas na resistência em plantas (BENTEM, *et al.*, 2005).

Além destas proteínas citadas, todas as que foram incluídas na tabela então envolvidas, de alguma forma, na defesa contra patógenos. Duas delas, inclusive, a isoflavona redutase e a endo-1,3-β-D-glucosidase, estão envolvidas na defesa contra nematóides, segundo a bibliografia (POTENZA, *et al.*, 2001; GIEBEL, 1976).

Contig N°	N° de Reads	Anotação	Organismo Homólogo	E-value
CL41Contig1	4	Pyruvate decarboxylase	<i>Lotus corniculatus</i>	0.0
CL69Contig1	3	Translation initiation factor 5A	<i>Hevea brasiliensis</i>	4e-84
CL82Contig1	2	Superoxide dismutase	<i>Fagus sylvatica</i>	8e-80
CL144Contig1	2	Molecular chaperone Hsp90	<i>Nicotiana benthamiana</i>	e-108
CL188Contig1	2	Reversibly glycosylated polypeptide	<i>Gossypium hirsutum</i>	e-110
CL223Contig1	2	Leucine-rich repeat protein	<i>Citrofortunella mitis</i>	6e-81
GhAS_0731	1	Isoflavone reductase	<i>Lupinus albus</i>	3e-93
GhAS_0752	1	Endo-1,3-β-D-glucosidase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	5e-82
GhAS_0944	1	Peroxiredoxin	<i>Populus tremula x P. tremuloides</i>	9e-52
GhAS_0954	1	BRASSINAZOLE-RESISTANT 1 protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	9e-78
GhAS_0966	1	Skp1	<i>Medicago sativa</i>	1e-67
GhAS_0970	1	Cyclophilin	<i>Oryza sativa</i>	7e-81
GhAS_0972	1	Vesicle transport v-SNARE 13	<i>Arabidopsis thaliana</i>	7e-78
GhAS_0649	1	Class IV chitinase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	3e-28
GhAS_0719	1	Actin depolymerizing factor 1 (ADF1)	<i>Petúnia x hybrida</i>	2e-66
GhAS_0753	1	Hypersensitive-induced response protein	<i>Cucumis sativus</i>	2e-78
GhAS_0767	1	Dirigent protein	<i>Gossypium barbadense</i>	8e-81
GhAS_0803	1	Bacterial-induced peroxidase precursor	<i>Gossypium hirsutum</i>	3e-19
GhAS_0821	1	Calcium-dependent protein kinase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	9e-97
GhAS_0879	1	Cinnamoyl-CoA reductase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1e-58

Tabela 1. Genes de resistência a estresse biótico expressos somente na planta de algodão resistente a nematóides.

PERSPECTIVAS

As seqüências potencialmente envolvidas com a resistência serão avaliadas por PCR em tempo real, visando confirmar os genes expressos diferencialmente na planta de algodão resistente a nematóides. Experimentos de superexpressão e RNAi (RNA interferente) serão posteriormente utilizados em plantas modelo, via engenharia genética, para validação das diferentes seqüências.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal Molecular Biology**. p. 403-410. 1991.
- BENTEM, S.F.; VOSSEN, J.H.; VRIES, K.J.; WEES, S.; TAMELING, W.I.L.; DEKKER, H.L.; KOSTER, C.G.; HARING, M.A.; TAKKEN, F.L.W.; CORNELISSEN, B.J.C. Heat shock protein 90 and its co-chaperone protein phosphatase 5 interact with distinct regions of the tomato I-2 disease resistance protein. **The Plant Journal**. v. 43, p. 284–298, 2005.
- CHITWOOD, D.J. Phytochemical Based Strategies for Nematode Control. **Annual Review Phytopathology**. p. 221-249, 2002.
- EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**. v. 8, p. 175-185. 1998.
- FINN, R.; MISTRY, J.; SCHUSTER-BOCKLER, B.; GRIFFITHS-JONES, S.; HOLLICH, V.; LASSMANN, T.; MOXON, S.; MARSHALL, M.; KHANNA, A.; DURBIN, R.; EDDY, S.; SONNHAMMER, E.; BATEMAN, A. Pfam: clans, web tools and services. **Nucleic Acids Research** v.34, p. D247–D251, 2006.
- GIEBEL, J. Beta-glucosidase activity in potato roots and its possible role in plant tissue response to *Heterodera rostochiensis*. Bulletin de l'Académie polonaise des sciences. **Série des sciences biologiques** v.24, p. 37-42, 1976.
- HAN, C.U.; LEE, C.H.; JANG, K.S.; CHOI, G.J.; LIM, H.K.; KIM, J.C.; AHN, S.N.; CHOI, J.E.; CHA, J.S.; KIM, H.T.; CHO, K.Y.; LEE, S.W. Identification of Rice Genes Induced in a Rice Blast-resistant Mutant. **Molecules and Cells** v.17, p. 462-468, 2004.
- HUANG, G.; ALLEN, R.; DAVIS, E.L.; BAUM, T.J.; HUSSEY, R.S. Engineering broad root-knot resistance in transgenic plants by RNAi silencing of a conserved and essential root-knot nematode parasitism gene. **Proceeding National Academy of Science**. v.103, p.14302-14306, 2006.

- KUŹNIAK, E.; SKŁODOWSKA M. Fungal pathogen-induced changes in the antioxidant systems of leaf peroxisomes from infected tomato plants. **Planta** v.222, p. 192–200, 2005.
- POTENZA, C.; THOMAS, S.H.; SENGUPTA-GOPALAN, C. Genes Induced during early response to *Meloidogyne incognita* in roots of resistance and susceptible alfalfa cultivars. **Plant Science**. p. 289-299, 2001.
- SMITH, G.R.; VEECH, J.A.; GANNAWAY, J.R. The effects of *Meloidogyne incognita* on cotton development and fiber quality on the Texas high plains. Proc. Beltwide Cotton Conf., pp. 177-179. **National Cotton Council** Am., San Antonio, TX, 1991.
- TADEGE, M.; DUPUIS, I.; KUHLEMEIER, C. Ethanol fermentation: new functions for an old pathway. **Trend in Plant Science** v.4, p. 320-325, 1999.
- TATUSOV, R.L.; FEDOROVA, N.D.; JACKSON, J.D.; JACOBS, A.R.; KIRYUTIN, B.; KOONIN, E.V.; KRYLOV, D.M.; MAZUMDER, R.; MEKHEDOV, S.L.; NIKOLSKAYA, A.N.; RAO, B.S.; SMIRNOV, S.; SVERDLOV, A.V.; VASUDEVAN, S.; WOLF Y.I.; YIN, J.J.; NATALE, D.A. The COG database: an updated version includes eukaryotes. **BMC Bioinformatics** 4, 2003.
- WANG C, ULLOA M, ROBERTS PA. Identification and mapping of microsatellite markers linked to a root-knot nematode resistance gene (rkn1) in Acala NemX cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Theoretical Applied Genetics** p. 770–777, 2006.
- WILLIAMSON, V.M.; GLEASON, C.A. Plant-nematode interactions. **Current Opinion in Plant Biology** v.6, p. 327-333, 2003.
- WILLIAMSON, V.M.; KUMAR, A. Nematode resistance in plants: the battle underground. **Trends in Genetics** v.22, p. 396-403, 2006.

IDENTIFICAÇÃO DE SEQÜÊNCIAS EXPRESSAS ETIQUETADAS (ESTs) ENVOLVIDAS NA INTERAÇÃO DE ARROZ E DO FUNGO CAUSADOR DA BRUSONE (*Magnaporthe grisea*)

Bevitori, R.¹; Reis, M.S.²; Diógenes, R.²; Brondani, R.V.¹; da Silva, F.R.³; de Paula, A.W.M⁴; Grossi-de-Sá, M.F.^{3, 4}.

¹EMBRAPA Arroz e Feijão; ²UCG – Universidade Católica de Goiás; ³EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, ⁴UCB – Universidade Católica de Brasília.
bevitori@cnpaf.embrapa.br

RESUMO

A ocorrência de perdas na produtividade e na qualidade da cultura de arroz em decorrência de doenças fúngicas é uma realidade na agricultura nacional, causando substanciais prejuízos à economia e à sociedade. A brusone, causada pelo fungo *Magnaporthe grisea*, é a doença do arroz mais expressiva no Brasil, provocando perdas significativas na produtividade das cultivares susceptíveis, sendo de difícil controle químico, cultural e mesmo genético. Nesse contexto, cobre-se de particular relevância a utilização de aplicações inovadoras, com potencial de inovação tecnológica, relacionadas a mecanismos de respostas, sejam elas moleculares, fisiológicas, bioquímicas ou genéticas da planta a este fungo. Considerando que um dos requisitos primordiais para o uso das novas ferramentas biotecnológicas é a identificação de genes, duas bibliotecas subtrativas foram construídas utilizando-se mRNA isolado de folhas de arroz infectadas por *M. grisea*, com o objetivo de construir um banco de ESTs visando analisar a expressão de genes induzidos ou suprimidos durante a interação patógeno-hospedeiro. Até o presente momento, 1232 ESTs foram geradas e a análise das mesmas, utilizando métodos computacionais, encontra-se em andamento. Adicionalmente, a fornecer informações do modelo de expressão de genes de defesa do arroz, este estudo disponibilizará genes para estudos de genômica funcional e desta maneira poderá elucidar o mecanismo de resistência da planta a este fungo.

INTRODUÇÃO

O Brasil é o nono produtor mundial de arroz (*Oryza sativa* L.), uma das principais fontes de alimento da população brasileira, o que lhe confere grande importância sócio-econômica. Entretanto, um dos graves obstáculos para a manutenção e estabilidade da produção nacional de arroz, cultivado em todas as regiões do país, é a susceptibilidade das cultivares ao fungo *Magnaporthe grisea*, causador da brusone, considerada a mais importante enfermidade do arroz devido ao seu alto potencial destrutivo (OU, 1985). A brusone ocorre em todo o território brasileiro, do Rio Grande do Sul ao Amazonas. Os prejuízos são variáveis, sendo maiores em arrozais de terras altas, no Centro-Oeste brasileiro, onde, em situações mais drásticas, as perdas podem chegar até a 100%. No Rio Grande do Sul, maior produtor nacional de arroz, a doença causa grandes danos, atingindo, em alguns anos, 10% da área semeada, provocando reduções desde 10-15% até 70-80% da média da produção de lavoura (IRGA, 1997). No Estado do Tocantins, que cultiva anualmente cerca de 70 mil hectares de arroz, embora não existam estimativas, os prejuízos são significativos, com severa ocorrência da brusone nas folhas devido à falta de água na fase vegetativa. Apenas na Região Nordeste e nos Estados do Pará e Amazonas, a incidência da brusone é baixa e menos importante do que outras doenças que afetam o arroz.

O controle da brusone vem sendo feito pela aplicação de fungicidas e do manejo da cultura, além do uso de cultivares resistentes. No entanto, problemas associados a práticas culturais específicas ocorrem, e a resistência do *M. grisea* ao fungicida é uma preocupação constante dos cientistas, ao mesmo tempo em que há uma considerável necessidade de desenvolvimento de novos fungicidas compatíveis com o ambiente e com a durabilidade no manejo da doença. A obtenção de cultivares resistentes à brusone pelo método clássico de melhoramento é dificultada em função da alta variabilidade e da existência de numerosas raças do fungo. Dois a três anos após o lançamento, novas cultivares se tornam susceptíveis, em decorrência do aparecimento de novas raças. Embora o mapeamento de mais de 25 genes de resistência e muitos QTL tenham sido relatados na literatura, o mecanismo genético da resistência à brusone, bem como a base molecular da resposta do arroz a este fungo, é ainda pouco entendida (WANG *et al.* 1999; BRYAN *et al.* 2000; ZHUANG *et al.*, 2002).

Neste contexto, o presente estudo deverá gerar inúmeras possibilidades para estudos da relação estrutura/função gênica via análise genômica funcional, de prospecção de genes e mapeamento comparativo.

MATERIAL E MÉTODOS

Material biológico

Duas linhas semi-isogênicas para resistência à brusone, desenvolvidas na Embrapa Arroz e Feijão, foram utilizadas neste estudo. A linha resistente C101 LAC e a susceptível C101 PKT foram desafiadas com isolados do fungo *M. grisea* (ID 14 isolado de Metica 1). Duzentas folhas de cada tratamento, com sintomas típicos de brusone, foram coletadas nos períodos de 4, 24, 48 e 72 horas após a inoculação, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a -80° C até o momento do uso. O mesmo procedimento foi efetuado para o controle (sem infecção).

Construção da biblioteca subtrativa

O RNA total foi isolado utilizando Trizol (Invitrogen) e tratado com Turbo DNA-free (Ambion). Quantidades iguais de RNA de cada tratamento foram misturadas, e o mRNA foi extraído com o kit Oligotex (Qiagen). Para a construção da biblioteca subtrativa, utilizou-se kit PCR Select cDNA Subtraction (Clontech), segundo recomendações do fabricante, com leves modificações. Duas bibliotecas, uma direta e outra reversa, foram construídas. Os produtos da última reação de PCR foram clonados no vetor PCR 2.1 (Invitrogen) e, posteriormente, células competentes de *Escherichia coli* DH5 α foram transformadas.

Seqüenciamento e análise dos dados

Clones de cDNA foram seqüenciados na direção 5' usando ABI PRISM 3100 (Applied BioSystems) e o kit de seqüenciamento Big-dye terminator (Applied BioSystems). Os cromatogramas referentes ao seqüenciamento automático dos clones foram analisados utilizando-se o software Phred (EWING *et al.*, 1998). As seqüências geradas foram processadas, com remoção de seqüências provenientes de rRNA e eliminação de porções contendo seqüências de vetor, adaptador, caudas de *poliA* e bases de baixa qualidade. Posteriormente, as seqüências foram agrupadas com uso do programa CAP3 (HUANG e MADAN, 1999) para a formação do conjunto UniGene de Arroz, conforme metodologia estabelecida por Telles e da Silva (2001), com algumas modificações. As seqüências consenso de cada UniGene foram comparados com seqüências protéicas presentes no GenBank, utilizando-se o software BlastX (ALTSCHUL *et al.*, 1997). Apenas semelhanças com *e-values* maiores que 0.00001 (10⁻⁵) foram consideradas.

RESULTADOS

Do total de 1.232 ESTs geradas, 852 foram agrupadas em 683 *contigs*. Destes, 595 são formados por apenas uma leitura. O *contig* mais denso é formado por 27 leituras. Do total, 214 (35%) não apresentam similaridade com proteínas já descritas. A anotação funcional se encontra em andamento.

PERSPECTIVAS

Espera-se obter uma coleção de ESTs adequada para utilização em posteriores estudos de identificação de genes envolvidos na interação planta-*M. grisea*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTSCHUL S.F.; MADDEN T.L.; SCHAFFER A.A.; ZHANG J.; ZHANG Z.; MILLER W.; LIPMAN D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25 p.:3389-402. 1997.
- BRYAN, G.T.; WU, K-S.; FARRAL, L.; JIA, Y.; HERSHEY, H.P.; McADAMS, S.A.; FAULK, K.N.; Donaldson, G.K.; TARCHINI, R.; VALENT, B. A single amino acid difference distinguishes resistant and susceptible alleles of the rice blast resistance gene *Pi-ta*. **Plant Cell**, v. 12, p. 2033-2045. 2000.
- EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.C.; GREEN, P.. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, v. 8, p. 175-185. 1998.
- FISHER, R.A. "On the interpretation of χ^2 from contingency tables, and the calculation of P". **Journal of the Royal Statistical Society**, v. 85, p. 87-94. 1922
- HUANG, X.; MADAN, A. CAP3: A DNA sequence assembly program. **Genome Research**, v. p. 868-877. 1999.
- IRGA. Arroz: custo de produção médio ponderado em sistema convencional RS, safra 96/97. **Cachoeirinha**, v.12, p.1-47, 1997.
- OU, S.H. Rice disease. 2 ed. Kew: **CMI**, 1985. 380p
- TELLES, G.P.; DA SILVA, F.R. Trimming and clustering sugarcane ESTs. **General. Molecular Biology**, v. 24, p. 17-23. 2001.
- ZHUANG, J.Y.; MA, W.B. ; WU, J.L.; CHAI, R.Y.; LU, L.; FAN, Y.Y.; JIN, Z.M.; LEUNG, H.; ZHENG, K.L. Mapping of leaf and neck blast resistance genes with resistance gene analog, RAPD and RFLP in rice. **Euphytica**, v. 128, p. 363-370. 2002.

WANG, Z.X. ; YANO, M. ; YAMANOUCHI, U ; IWAMOTO, M.; MONNA, L.; HAYASAKA, H.; KATAYOSE, Y.; SASAKI, T. The *Pib* gene for the rice blast resistance belongs to the nucleotide binding and leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. **Plant Journal**, v. 19, p.55-64. 1999.

PLANTAS TRANSGÊNICAS DE *Nicotiana tabaccum* EXPRESSANDO dsRNA QUE CONFERE RESISTÊNCIA A *Meloidogyne incognita*

Souza, D.S.L.^{1,3}; Sousa, B.A.^{1,4}; Pires, N.F.^{1,5}; Romano, E.¹; Rocha, T.L.¹; Oliveira, G.R.¹; Barbosa, A.E.A.D.; Teixeira, F.M.¹; Martins de Sá, C.³; Fragoso, R.R.²; Murad, A.M.^{1,4}; Silva, M.C.M.¹; Carneiro, R.M.D.G.¹; Grossi-de-Sá, M.F.^{1,3}

¹EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia; ²EMBRAPA Cerrados; ³UNB - Universidade de Brasília;

⁴UCB - Universidade Católica de Brasília; ⁵FTB - Faculdades Integradas da Terra de Brasília.

djairsouza@yahoo.com.br

RESUMO

Os fitonematóides do gênero *Meloidogyne* estão entre os mais prejudiciais à economia agrícola mundial. Estes fitoparasitas são responsáveis por 95% de todas as infestações por nematóides das galhas no mundo, e infectam mais de 1.700 espécies de plantas (Huang *et al.*, 2006). A gravidade das perdas causadas por meloidoginoses tem estimulado, há décadas, programas de melhoramento visando a obtenção de variedades resistentes. Estratégias biotecnológicas estão sendo desenvolvidas com o objetivo de controlar estes fitopatógenos. Dentre estas estratégias, a técnica do RNA interferente tem se destacado por elucidar a função de genes e determinar os que são essenciais ao fitoparasitismo. Genes com potencial envolvimento no parasitismo podem ser utilizados como alvo para nocaute de expressão e bloqueio do desenvolvimento dos fitonematóides. O presente trabalho descreve uma estratégia para o silenciamento *in vivo* de um novo gene expresso na glândula esofagiana dorsal de *M. incognita* durante sua fase parasitária. Inicialmente, uma seqüência de 450 pares de bases do gene *Mipsg18* foi clonada em vetor GATEWAY para a expressão de RNAi em plantas. A construção resultante foi introduzida em *Agrobacterium tumefaciens* (linhagem EHA 105) e, posteriormente, plantas de fumo *Nicotiana tabaccum* (xantii) foram transformadas por co-cultura de *Agrobacterium* com discos foliares. Transformantes primários (T0), inoculados individualmente com 10.000 ovos de *M. incognita*, mostraram níveis elevados de resistência ao parasita – confirmada por PCR – 45 dias após os inóculos. As plantas *Mipsg18* positivas apresentaram, em média, um número de ovos 86% menor do que as linhagens transformadas com o vetor. Os resultados foram confirmados com a progênie das linhagens T0 resistentes, indicando, portanto, que esta estratégia pode ser utilizada para a obtenção de cultivares economicamente importantes, os quais poderão ser aplicados no controle de fitonematóides.

INTRODUÇÃO

Os fitonematóides são responsáveis por prejuízos que ultrapassam 125 bilhões de dólares anuais (Bakhtia *et al.*, 2005) e a maioria dos danos são atribuídos aos endoparasitas sedentários obrigatórios, representados pelos nematóides dos cistos (*Heterodera* spp. e *Globodera* spp.) e pelos formadores de galhas nas raízes (*Meloidogyne* spp.), sendo o *M. incognita* o mais prejudicial à agricultura mundial. Estes fitopatógenos 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).

O parasitismo de plantas por nematóides tem uma longa história evolutiva, ainda difícil de ser interpretada em função do limitado conhecimento sobre a origem e a distribuição das especializações morfológicas, bioquímicas, genéticas e comportamentais, as quais transformaram organismos de vida livre em parasitas altamente adaptadas a diversos tecidos e espécies vegetais (Baldwin *et al.*, 2004). Diversos estudos genômicos têm mostrado, principalmente para os fitonematóides sedentários, o importante papel dos produtos das glândulas de secreções – como glucanases, xilanases e pectinases – no processo de invasão dos tecidos das plantas hospedeiras (Vanholme *et al.*, 2004). A expressão de outros genes glandulares tem sido relacionada com o controle dos processos celulares da planta hospedeira, levando à formação dos sítios de alimentação. Neste caso, pode-se destacar a corismato mutase de *Meloidogyne javanica* (Mj CM-1), expressa em raízes de soja, que acarretou a diminuição dos níveis de auxinas e a desdiferenciação celular (Doyle & Lambert., 2003). Este evento pode estar relacionado com a etapa de iniciação da célula gigante. A liberação desta proteína pelo nematóide no citoplasma da planta também pode levá-la à inibição da resistência (Bekal *et al.*, 2003). Posteriormente, outros peptídeos, como o HG-SYV46, expresso em plantas de *Arabidopsis*, levou a efeitos fenotípicos, como a terminação prematura do meristema apical, após a regulação negativa da expressão do fator de transcrição WUSCHEL (Wang *et al.*, 2005).

Adicionalmente, a expressão de um peptídeo de seqüência pioneira (16D10) de *M. incognita* em plantas de *Arabidopsis*, provocou a proliferação anormal das raízes, podendo estar relacionado com o processo de formação do sítio de alimentação (Huang *et al.*, 2006). A importância deste peptídeo para o parasitismo foi confirmada pela expressão de 16D10 dsRNA em *Arabidopsis*, levando à resistência a *M. incognita* por

RNA de interferência (Huang *et al.*, 2006). Recentemente, esta técnica tem sido empregada para se obter plantas transgênicas resistentes a meloidioses (Bakhetia *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2006). Estas plantas expressando RNAi são capazes de silenciar a expressão de genes essenciais ao fitoparasitismo.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi obter plantas de tabaco resistentes a *M. incognita* por meio da expressão de dsRNA contra transcritos do gene *Mipsg18*.

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 o inóculo foram processadas segundo a metodologia prescrita por Hussey e Barker (1973). As fêmeas foram coletadas em uma peneira de 100µM e em seguida separadas em um tubo eppendorf para posterior extração de RNA e síntese de cDNA.

Clonagem do gene Mipsg18 em vetores para expressão de dsRNA em plantas.

A partir de um banco de cDNAs de *M. incognita* produzido em nosso laboratório, foram selecionados diversos genes potencialmente envolvidos com o fitoparasitismo e altamente expressos nas glândulas esofagianas de secreção deste fitonematóide. Uma destas seqüências, a *Mipsg18*, foi utilizada para a obtenção de plantas transgênicas resistentes a *M. incognita*. Para isto, um fragmento de aproximadamente 450pb do gene *Mipsg18* foi clonado a partir de um produto de PCR em vetores do sistema GATEWAY até o vetor destino pk7GWIWG2(I), para a expressão de dsRNA em plantas. Os oligos utilizados contendo os sítios attB1 (Forward) e attB2 (Reverse) foram: **Mi 18 F:** 5'-GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT AGT GAA TAC AGG CAT TCC GAG C. **Mi 18 R:** 5'-GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC TTA GTT CAT CAT ATT TTT GC e a construção obtida para a transformação das plantas de fumo foi designada pk7Mipsg18(Figura 1).

pk7Mipsg18

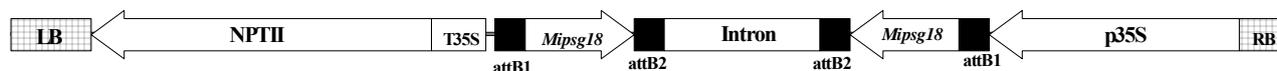


Figura 1. Construção pk7Mipsg18 para expressão de dsRNA em plantas de *Nicotiana tabacum*. LB- borda esquerda, NPTII - gene da neomicina fosfotransferase II, T35S – terminador do promotor CaMV 35S, attB1 – sítio de recombinação, *Mipsg18* – gene *Mipsg18*, attB2 – sítio de recombinação, Intron – seqüência formadora do “loop” do dsRNA p35S - promotor CaMV 35S, RB borda direita.

Transformação de plantas de fumo.

A construção pk7Mipsg18, bem como o vetor pk7GWIWG2(I), foram introduzidos em *Agrobacterium tumefaciens* (EHA 105) por eletroporação e, posteriormente, para plantas de fumo pelo método da co-cultura de discos foliares (Horsch *et al.*, 1985). Os transformantes foram identificados pela resistência a canamicina e confirmados via PCR. As plantas transgênicas foram aclimatadas em casa de vegetação para serem testadas quanto à resistência a *M. incognita*.

Desafio das plantas transgênicas.

Os inóculos para o desafio das plantas transgênicas de fumo foram feitos em casa de vegetação, onde os transformantes primários (T0), plantados em jarros com 3kg de solo, foram inoculados com 10.000 ovos de *M. incognita*, enquanto as progênies (T1) das linhagens T0 resistentes, acondicionadas em jarros com 400 gramas de substrato, foram desafiadas com 3.000 ovos dos nematóides. Passados 45 dias, as raízes foram removidas e coradas com flocsina, um corante usado para a visualização das massas de ovos. Os ovos totais de cada raiz foram extraídos com hipoclorito de sódio 0,5% e contados em microscópio com o auxílio de uma câmara de Peters. Para a avaliação da resistência a *M. incognita* de todas as plantas, foi determinado o número total de ovos por grama de raiz e feita a comparação das plantas contendo a construção pk7Mipsg18 com as plantas transformadas com o vetor comercial pk7GWIWG2(I).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O gene *Mipsg18* foi selecionado como potencial alvo para o controle de *M. incognita* devido à sua alta e específica expressão na glândula dorsal do parasito, visto por hibridização *in situ* (Figura 2A), apesar da não similaridade desta seqüência com qualquer outro grupo de genes conhecidos. Plantas transgênicas de

fumo mostraram níveis elevados de resistência a *M. incognita*, apresentando, em média, 86% de redução no número de ovos em relação às linhagens controle transformadas com o vetor (Figura 2B). Algumas plantas pk7Mipsg18 não apresentaram galhas, massas de ovos ou ovos (Figura 2D), enquanto os controles apresentaram muitas massas de ovos na superfície das raízes, reveladas com o corante flocsina (Figura 2C). Estes resultados foram confirmados para os transformantes primários (T0) e para linhagens das progênes (T1), 45 dias após os inóculos. A introdução de dsRNA em nematóides parasitas de plantas tem sido feita desde 2002 pelo método de *soaking* (Urwin *et al.*, 2002) e atualmente alguns genes de espécies de *Meloidogyne* já foram silenciados (Shingles *et al.*, 2006; Rosso *et al.*, 2005 Fanelli *et al.*, 2004; Bakhetia *et al.*, 2005). A eficiência do RNAi para o controle de fitonematóides foi confirmada *in vivo*, com fumo (Yadav *et al.*, 2006) e arabidopsis (Huang *et al.*, 2006). No primeiro trabalho, plantas transgênicas de fumo expressando dsRNA contra uma integrase e um fator de *splicing* de *M. incognita* apresentaram controle total do patógeno. Plantas de arabidopsis expressando dsRNA contra o gene 16D10 de *M. incognita* apresentaram resistência de até 90% (Huang *et al.*, 2006), indicando que a expressão de dsRNA em hospedeiros apresenta indicativos melhores da eficiência do RNAi para o controle dos fitonematóides do que o ensaio *in vitro* (*soaking*), que demonstrou no máximo 70% de controle do parasita. Este fato pode ser resultado da constante ingestão do dsRNA e siRNA da planta pelo nematóide, enquanto no *soaking* a ingestão ocorre num único momento. Considerando a alta resistência a *M. incognita* obtida neste estudo, pode-se concluir que o gene *Mipsg18* é essencial para o parasitismo de *M. incognita*. Portanto, a expressão de dsRNA em plantas surge como uma excelente ferramenta para o controle de fitonematóides.

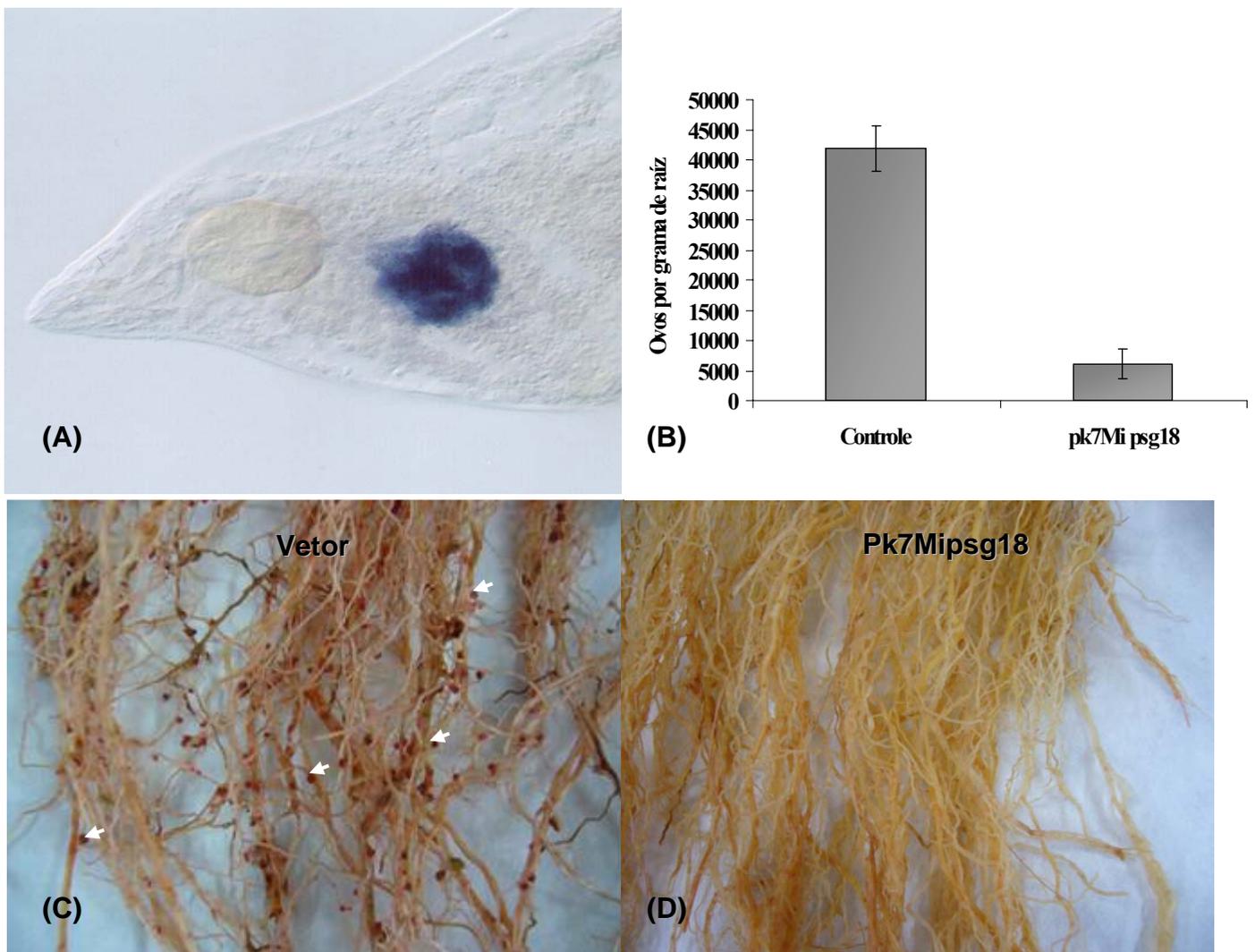


Figura 2. Expressão de dsRNAs em plantas de fumo, contra os transcrito do gene *Mipsg18* expresso em glândula salivar dorsal de fêmeas de *M. incognita*. (A) Hibridização *in situ* "whole mount", mostrando a alta e específica expressão do gene *Mipsg18* na glândula esofagiana dorsal do parasita. (B) Média do número

de ovos por grama de raiz, em plantas de fumo, 45 dias após os inóculos. Cada planta foi desafiada com 10.000 ovos de *M. incognita*, o gráfico mostra as médias dos números de ovos/grama de raiz para as plantas *Mipsg18* positivas e para os controles transformados com o vetor. Raízes de *Nicotiana tabaccum* após 45 dias de inóculo com 10.000 ovos de *M. incognita*, em que as raízes da planta controle (C) se encontram repletas de massas de ovos reveladas pelo corante flocsina e as das plantas transgênicas não apresentam aparentemente qualquer massa de ovos (D).

PERSPECTIVAS

É de grande interesse para o agronegócio a criação de cultivares transgênicos com alta e ampla resistência a nematóides. A introdução de um dsRNA em plantas permite o silenciamento até de grupos gênicos em pragas ou patógenos, desde que sejam selecionadas regiões conservadas das seqüências. Os resultados obtidos neste trabalho indicam que a expressão em plantas do dsRNA para o gene *Mipsg18* pode ser uma boa estratégia a ser aplicada em cultivares de grande importância agrônômica afetadas por espécies do gênero *Meloidogyne*. Como exemplos, podemos salientar o café, o algodão e a cana-de-açúcar. Além disso, serão realizadas avaliações em campo sobre os possíveis riscos do dsRNA para mamíferos, assim como ensaios de citotoxicidade. Este trabalho abre caminho para a utilização de outros genes de parasitismo de fitonematóides como alvos para a criação de plantas transgênicas resistentes expressando dsRNA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAKHETIA, M.; CHARLTON, W.; ATKINSON, H.J.; MCPHERSON, M.J. RNA interference of dual oxidase in the plant nematode *Meloidogyne incognita*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 10, p.1099-106.
- BALDWIN, J.G.; NADLER, S.A.; ADAMS, B.J. Evolution of plant parasitism among nematodes. **Annual review phytopathology**, v. 42, p. 83-105. 2004.
- ELBASHIR S.M.; HARBORTH J.; WEBER K.; TUSCHLA; T. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. **Methods**, v. 26, p. 199-213. 2002.
- FANELLI, E. *et al.* (2005) Analysis of chitin synthase function in a plant parasitic nematode, *Meloidogyne artiellia*, using RNAi. **Gene**, v. 349, p. 87-95.
- GOODRIDGE, H.S.; DEEHAN, M.R.; HARNETT, W.; HARNETT, M.M. Subversion of immunological signaling by a filarial nematode phosphorylcholine-containing secreted product. **Cellular Signalling**, v. 17, p. 11-16, 2005.
- HUANG, G.; ALLEN, R.; DAVIS, L.E.; BAUM, T.J.; HUSSEY, R.S. Engineering broad root-knot resistance in transgenic plants by RNAi silencing of a conserved and essential root-knot nematode parasitism gene. **Proceeding National Academy of Science**, v. 103, p.1432-1436. 2006
- 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**, v.16, p. 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.
- HORSCH RB, FRY JE, HOFFMANN NL, EICHHOLTZ D, ROGERS SG, FRALEY RT A simple and general method for transferring genes into plants. **Science**, v. 227, p. 1229-1231, 1985
- 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**, v. 121, n.2, p. 205-211. 2002.
- LILLEY, C.J.; URWIN, P.E.; ATKINSON, H.J. Characterization of plant nematode genes: identifying target for a transgenic defence. **Parasitology** v. 118, p. S630-S672. 1999.
- 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**, v. 6, n. 406(6791), p. 36-37. 2000.
- ROSSO, M. N.; DUBRANA, M. P.; CIMBOLINI, N.; JAUBERT, S.; ABAD, P. Application of RNA Interference to Root-Knot Nematode Genes Encoding Esophageal Gland Proteins. **The American Phytopathological Society**, v.18, p. 615-620. 2005.
- 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**, v. 12 n. 7, p. 585-591. 1999.