

**Biblioteca combinatória de genes para  
inibidores de  $\alpha$ -amilases: seleção de  
novos genes com potencial aplicação no  
controle de insetos-praga de  
armazenamento**

## **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 185**

**Biblioteca combinatória de genes para  
inibidores de  $\alpha$ -amilases: seleção de  
novos genes com potencial aplicação no  
controle de insetos-praga de  
armazenamento**

Maria Cristina Mattar da Silva  
Fabíola Rodrigues Teixeira  
Rafael Perseghini del Sarto  
Cleiton Carlos Macedo da Cruz  
Isabel Cristina Bezerra Agasie  
Andréa Queiroz Maranhão  
Marise Coutinho Ventura  
Osmundo Brilhante de Oliveira Neto  
José Cesamildo Cruz Magalhães  
Thales Lima Rocha  
Maria Fátima Grossi de Sa

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 Marante*  
*Maria de Fátima Batista*  
*Maurício Machain Franco*  
*Regina Maria Dechechi Carneiro*  
*Sueli Correa Marques de Mello*  
*Vera Tavares de Campos Carneiro*  
Supervisor editorial: *Maria da Graça S. P. Negrão*  
Normalização Bibliográfica: *Maria Lara Pereira Machado*  
Editoração eletrônica:

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**

B 582 Biblioteca combinatória de genes para inibidores de  $\alpha$ -amilases: seleção de novos genes com potencial aplicação no controle de insetos-praga de armazenamento. / Maria Cristina Mattar da Silva ... [et al.]. – Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007.  
29 p. : il. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ISSN 1676-1340 ; 185)

1. Feijão - semente. 2. *Phaseolus vulgaris* - semente. 3. Insetos-praga. 4. *Zabrotes subfasciatus*. 5. *Acanthoscelides obtectus*. 6. Grão – armazenamento. 7. Planta – resistência. 8. DNA shufflin. 9. Phage display. I. Silva, Maria Cristina Mattar da. II. Série.

632.7 – CDD 21.

## Biblioteca combinatória de genes para inibidores de $\alpha$ -amilases: seleção de novos genes com potencial aplicação no controle de insetos-praga de armazenamento

---

Maria Cristina Mattar da Silva<sup>1</sup>  
Fabíola Rodrigues Teixeira<sup>2</sup>  
Rafael Perseghini del Sarto<sup>3</sup>  
Cleiton Carlos Macedo da Cruz<sup>4</sup>  
Isabel Cristina Bezerra Agasie<sup>5</sup>  
Andréa Queiroz Maranhão<sup>6</sup>  
Marise Coutinho Ventura<sup>7</sup>  
Osmundo Brilhante de Oliveira Neto<sup>8</sup>  
José Cesamildo Cruz Magalhães<sup>9</sup>  
Thales Lima Rocha<sup>10</sup>  
Maria Fátima Grossi de Sa<sup>11</sup>

### Resumo

O feijoeiro ocupa grande área cultivada e é uma das culturas de subsistência de grande importância na agricultura do país. A cultura sofre grandes perdas na produção devido ao ataque de insetos-praga, entre as quais se destacam o *Zabrotes subfasciatus* e o *Acanthoscelides obtectus*, que atacam grãos armazenados. Estes carunchos causam diversos danos aos grãos, incluindo a destruição dos cotilédones, que reduz a massa das sementes, além de favorecer a entrada de microorganismos e ácaros por meio das galerias feitas por suas larvas, comprometendo a qualidade comercial dos grãos. Estratégias biotecnológicas aplicada à prospecção de genes visam disponibilizar novas moléculas como ferramentas no desenvolvimento de plantas resistentes a insetos-praga. Dentro desse objetivo, foi utilizada uma estratégia que combina duas metodologias (*DNA shuffling* e *Phage display*) visando a evolução *in vitro* de moléculas. Os genes  $\alpha$  *A1* e  $\alpha$  *A2* para os inibidores de  $\alpha$ -amilases, isolados de sementes de *Phaseolus vulgaris*, foram utilizados na construção de uma biblioteca combinatória de moléculas de  $\alpha$  *A1s*, no qual foram selecionados 11 genes para novos mutantes de inibidores de  $\alpha$ -amilases que apresentaram afinidade com a  $\alpha$ -amilases de *Z. subfasciatus*. Esses genes foram introduzidos em plantas

---

<sup>1</sup> Doutor em Biologia Molecular, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

<sup>2</sup> Bacharel em Biologia, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

<sup>3</sup> Doutorando em Biologia Molecular, Universidade de Brasília

<sup>4</sup> Bacharel em Biologia, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

<sup>5</sup> Doutor, Embrapa Hortaliças

<sup>6</sup> Doutor em Biologia Molecular, Universidade de Brasília

<sup>7</sup> Mestre em Ciências Biológicas, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

<sup>8</sup> Doutor em Biologia Molecular, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

<sup>9</sup> Técnico Nível Superior, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

<sup>10</sup> Doutor em Bioquímica, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

<sup>11</sup> Doutor em Biologia Molecular, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

de *Arabidopsis thaliana* para a expressão de proteínas ativas e a atividade inibitória foi avaliada *in vitro* contra  $\alpha$ -amilases de bruquídeos. Os resultados mostraram que as novas proteínas possuem especificidades diferentes dos inibidores originais, indicando a eficiência da estratégia utilizada, na geração de novos genes com potencial para serem utilizados no controle de insetos-praga de armazenamento.

## Abstract

*Phaseolus vulgaris* is one of the most important crops in agriculture. However, crop production is affected significantly by bruchid larvae, such as *Zabrotes subfasciatus* and *Acanthoscelides obtectus* which infest seeds of cultivated varieties of the common bean. These bruchids cause various kinds of crops damage, including the destruction of the cotyledon with resulting loss of seed weight, as well as facilitating the entry of microorganisms and mites through the tunnels made by the larvae, thereby reducing the quality of the beans. Biotechnology strategies aim to create new variant protein molecules as tools for the production of plants that are resistant to bruchids. For this purpose a combination of two techniques was applied, DNA *shuffling* and *Phage Display*, in the search for new molecules which are active against pests of stored grains. The genes which encode for alpha-amylase inhibitors,  $\alpha$ AI-1 and  $\alpha$ AI-2 of *Phaseolus vulgaris* were used to construct a combinatorial library. 11 mutant genes of alpha-amylase inhibitors were selected from this library using *Z. subfasciatus* alpha-amylase (ZSA). These genes were used to transform plants of *Arabidopsis thaliana* in order to produce active proteins which were tested *in vitro* against the bruchid  $\alpha$ -amylases. The results showed new proteins with different specificities from the original inhibitors. The strategy used in this work was efficient to produce candidate genes to be used in the pest control of stored grains.

## Introdução

A cultura do feijoeiro ocupa uma área superior a 10 milhões de hectares, sendo a leguminosa de maior importância na alimentação de mais de 500 milhões de pessoas na América Latina e África. O Brasil é o maior produtor mundial de feijão, e sua produção superou três milhões de toneladas na safra 2004/2005 (fonte: CONAB, 2007). No entanto, essa cultura sofre perdas significativas na produção devido ao ataque de insetos-praga. Dependendo da espécie da praga, da fase de desenvolvimento da cultura, da cultivar plantada e da época do plantio do feijoeiro, os danos causados podem chegar a 100% (Fonte: Embrapa Arroz e Feijão, 2006).

Dentre as pragas de grãos armazenados do feijoeiro estão incluídos os bruquídeos (designados comumente de carunchos) *Zabrotes subfasciatus* e *Acanthoscelides obtectus*. Estes insetos coleópteros são cosmopolitas, ocorrendo em todos os países que cultivam o feijoeiro, sendo que o *Z. subfasciatus* ocorre nas regiões mais quentes dos trópicos, enquanto que o *A. obtectus* é o principal caruncho do feijoeiro nas regiões temperadas, que têm clima ameno. A principal diferença entre estas duas espécies de carunchos é que a fêmea de *Z. subfasciatus* coloca seus ovos aderidos às sementes, e a fêmea do *A. obtectus* coloca seus ovos dispersos entre os grãos. Além disso, o *A. obtectus* pode iniciar o ataque antes da colheita do feijão, colocando os ovos nas vagens, enquanto o *Z. subfasciatus* só infesta os grãos após a colheita, no armazenamento do feijão. Esses carunchos causam danos aos grãos devido às galerias feitas por suas larvas, destruindo os cotilédones, reduzindo a massa das sementes e favorecendo a entrada de microorganismos e ácaros. Também destroem o embrião, afetando a germinação das sementes, além de desvalorizar a qualidade comercial dos grãos devido à presença de insetos, ovos e excrementos (fonte: Embrapa Arroz e Feijão, 2006).

Ao longo do tempo, as plantas desenvolveram diferentes estratégias para reduzir o ataque de insetos, por meio de mecanismos de defesa, representados por antibióticos, alcalóides, terpenos, glicosídeos cianogênicos, quitinases,  $\alpha$ -1,3 glucanases, lectinas, arcelinas, vicilinas, sisteminas e inibidores de enzimas hidrolíticas, tais como  $\alpha$ -amilases e proteinases, entre outras (Carlini & Grossi de Sa, 2002, Franco *et al.*, 2002).

As  $\alpha$ -amilases constituem uma família de enzimas que catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 do amido, glicogênio e outros carboidratos. Essas enzimas têm um papel importante no metabolismo de carboidratos em plantas, animais e outros organismos (Franco *et al.*, 2002), sendo, portanto, essenciais para o crescimento e desenvolvimento de muitos insetos. Existem vários relatos demonstrando a presença destas enzimas em insetos-praga com importância agrônômica, incluindo *Callosobruchus maculatus* (Campos *et al.*, 1989), *Z. subfasciatus* (Cardona *et al.*, 1990; Grossi de Sá, *et al.*, 1997) e *Anthonomus grandis* (Oliveira Neto *et al.*, 2003).

Em grãos de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) existe a presença de moléculas que os protegem contra o ataque a certos bruquídeos. Dentre as moléculas estão incluídas as fitohemaglutininas, as arcelinas e os inibidores de enzimas digestivas (Chrispells, Raikhel, 1991, Sales *et al.*, 2000). Os inibidores de  $\alpha$ -amilase ( $\alpha$  AIs) são uma importante família destas proteínas (Garcia Maroto *et al.*, 1991), ocorrendo naturalmente em muitas plantas, sendo particularmente abundantes em legumes e cereais (Franco *et al.*, 2002, Carlini & Grossi de Sa, 2002). São capazes de inibir  $\alpha$ -amilases de insetos-praga, mamíferos e microorganismos, mas não inibem as  $\alpha$ -amilases das plantas. Os  $\alpha$ AIs interferem no processo digestivo causando diminuição da assimilação de nutrientes por meio de ligação específica às  $\alpha$ -amilases presentes nos intestinos de insetos (Ryan, 1990).

Dentre os inibidores de enzimas digestivas, os inibidores  $\alpha$  AI e  $\alpha$  A2 foram bem caracterizados molecular e bioquimicamente, diferindo em suas especificidades de interações com diferentes  $\alpha$ -amilases. Entre eles, existe um grau de identidade seqüência de aminoácidos de 78%. O  $\alpha$  AI é encontrado em feijão cultivado e inibe a  $\alpha$ -amilase pancreática de porco (PPA) (Silva *et al.*, 2004), a  $\alpha$ -amilase salivar humana (HSA) (Ishimoto & Kitamura, 1989) e a  $\alpha$ -amilase dos bruquídeos *Callosobruchus maculatus* e *Callosobruchus chinensis*, mas não inibe a  $\alpha$ -amilase do caruncho do feijão mexicano *Z. subfasciatus* (ZSA) (Grossi de Sa *et al.*, 1997; Silva *et al.*, 2000, 2004), que representa um importante inseto-praga de sementes maduras de feijão comum (Grossi de Sa *et al.*, 1997). O  $\alpha$  A2 é encontrado em feijão silvestre não comercializado e inibe fortemente apenas a ZSA (Grossi de Sá *et al.*, 1997; Silva *et al.*, 2004). Particularmente, esses inibidores presentes em grãos de feijão necessitam de modificações pós-traducionais para se tornarem ativos (Young *et al.*, 1999, Prescott *et al.*, 2005). Estes são sintetizados no retículo endoplasmático na forma de pró-proteína e, após a perda do peptídeo sinal, encaminham-se para o Complexo de Golgi, onde sofrem glicosilações. Posteriormente, a proteína se acumula nos vacúolos de reserva, onde é clivada por enzimas específicas no aminoácido Asn77, originando o inibidor maduro na forma de duas cadeias  $\alpha$  (112 kDa) e duas cadeias  $\beta$  (57 kDa) (Young *et al.*, 1999).

Duas alças principais dos  $\alpha$ AI-1 e  $\alpha$ AI-2 (N-terminal – resíduos de 31 a 40 e C-terminal – resíduos de 181-190) estão envolvidas na interação com as enzimas-alvo (Bompard-Gilles *et al.*, 1996; Silva *et al.* 2000). Quatro genes para mutantes foram construídos com o uso da mutagênese sítio dirigida para inserir trocas de aminoácidos na seqüência das alças N e C-terminal do  $\alpha$  A2, baseadas na seqüência do  $\alpha$  AI. As proteínas codificadas pelos genes mutantes, mesmo contendo alta homologia com o inibidor  $\alpha$  A2, quando expressadas em plantas modelos de fumo não mostraram atividade sobre a enzima ZSA. Contudo, a alteração realizada nessas moléculas recombinantes também não resultou em atividade sobre a enzima digestiva de mamíferos (PPA) (Silva *et al.*, 2004). Os resultados desses estudos indicaram a necessidade de pesquisa adicional envolvendo simultaneamente um grande número de diferentes mutantes, para se elucidar a especificidade dessas moléculas. O entendimento completo do mecanismo de inibição das  $\alpha$ -amilases é fundamental para o



desenho e a construção de inibidores de  $\alpha$ -amilases específicos para insetos-praga de importância econômica na agricultura.

No presente estudo, foi adotada uma estratégia inovadora para gerar simultaneamente uma grande variedade de genes para mutantes de  $\alpha$ Als, visando a seleção de moléculas específicas e ativas contra pragas de interesse econômico na agricultura. Os genes  $\alpha$  A1 e  $\alpha$  A2 foram fragmentados e recombinados *in vitro* pela técnica *DNA shuffling* (Stemmer *et al.*, 1994; Zhao & Arnold, 1997). Para explorar amplamente a diversidade criada, o produto do *DNA shuffling* foi combinado com a técnica *Phage display* (Barbas III *et al.*, 2001), dando origem a uma biblioteca combinatória de genes para mutantes de  $\alpha$  Als. Esta estratégia possibilitou a seleção de onze genes variantes que apresentam afinidade pela enzima ZSA. Estes novos genes variantes foram introduzidos em plantas de *Arabidopsis* e as proteínas mutantes maduras apresentaram diferentes níveis de atividade inibitória em testes *in vitro* contra as enzimas dos bruquídeos (ZSA e  $\alpha$ -amilase de *A. obtectus* - AOA) e de mamíferos (PPA). Devido à diversidade apresentada, os novos genes representam moléculas com potencial nos estudos de especificidade e elucidação do mecanismo de interação enzima-inibidor envolvido no sistema planta-praga. Após a caracterização completa, os novos genes poderão ser recombinados separadamente ou em grupos em novos ciclos de *DNA shuffling* para melhorar as características desejadas. Em acréscimo, os novos genes poderão ser inseridos em construções do tipo pirâmide (clonagem de multigenes) para serem usados na transformação de plantas para conferir resistência a insetos-praga.

## METODOLOGIA

### OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo específico a geração e seleção de genes mutantes de inibidores de  $\alpha$ -amilases, utilizando-se a combinação das metodologias de *DNA shuffling* e *Phage display*. A obtenção de novas variantes de  $\alpha$  Als contribuirão para os estudos de especificidade de interação enzimas-inibidores e para a aplicação destes nos programas de melhoramento de plantas visando o controle de insetos-praga de armazenamento, via transgenia.

## MATERIAL E MÉTODOS

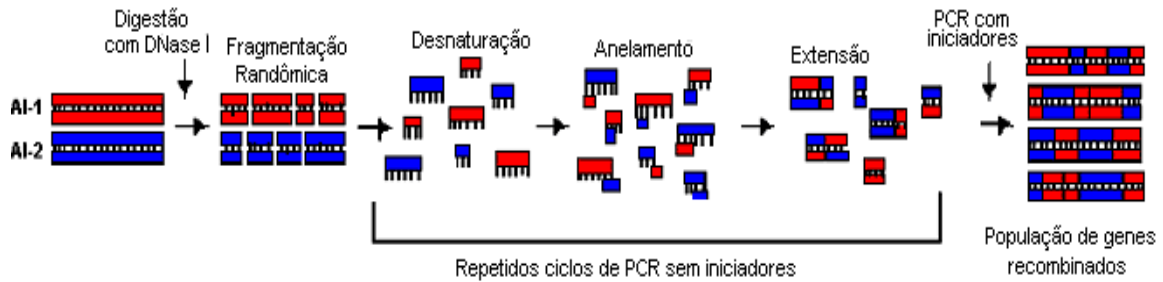
**Produção de genes para mutantes de  $\alpha$  Als utilizando a técnica *DNA shuffling***

Com o objetivo de construir uma biblioteca combinatória de mutantes de  $\lambda$  Als, os genes *AI-1* e *A2* isolados de sementes de *P. vulgaris* foram utilizados na aplicação da técnica *DNA shuffling* (Stemmer, 1994; Zhao & Arnold, 1997) (Figura 1). Os genes foram combinados na proporção de 1:1, totalizando 10 $\mu$ g. A mistura foi liofilizada, dissolvida em tampão da enzima *DNase I* (50mM de Tris, p.H. 7.5; 1mM de MnCl<sub>2</sub>; 0,1mg/mL de BSA) e digerida com 0,03 unidades da enzima durante 15 minutos, a 15 $^{\circ}$  C. A reação foi interrompida com a adição de 250mM de EDTA. O produto da fragmentação dos genes (fragmentos de 30 a 300pb) foi purificado de gel de agarose 2,5%.

O produto da digestão com *DNase I* (10 $\mu$ L) foi utilizado na reação de PCR sem adição de oligonucleotídeos. Nessa reação, que visa a recombinação dos fragmentos de diferentes tamanhos, foram utilizados 1X de tampão da polimerase *Taq Platinum High Fidelity* (Invitrogen), 0,4mM da mistura contendo os quatro dNTPs e 0,1U da enzima *Taq Platinum High Fidelity* (Invitrogen) para o volume de 25 $\mu$ L. As condições usadas na recombinação foram: 2 minutos a 95 $^{\circ}$  C; seguidos de 42 ciclos de 1 minuto a 95 $^{\circ}$  C; 1 minuto a 42 $^{\circ}$  C; 1 minuto, com acréscimo de 5 segundos por ciclo, a 72 $^{\circ}$  C; finalizando, foi feita uma etapa de extensão a 72 $^{\circ}$  C durante 7 minutos.

Uma alíquota contendo 1,5 $\mu$ L do produto resultante da PCR sem adição de oligonucleotídeos foram utilizados como molde para a segunda reação de amplificação. Para uma reação de 100 $\mu$ L, adicionou-se 1X de tampão de *Platinum Taq DNA polimerase High Fidelity* (Invitrogen), 0,2mM de cada dNTP, 2,5U de cada uma das enzimas *Taq DNA polimerase* (Invitrogen) e *Platinum Taq DNA polimerase High Fidelity* (Invitrogen) e 0,8  $\mu$  M de cada um dos oligonucleotídeos desenhados para a região N e C-terminal dos genes originais ( $\lambda$  *A1* e  $\lambda$  *A2*). As condições usadas na reação foram: 2 minutos a 95 $^{\circ}$  C, seguidos de 24 ciclos de 30 segundos a 95 $^{\circ}$  C; 30 segundos a 42 $^{\circ}$  C e 45 segundos a 72 $^{\circ}$  C, seguidos por 14 ciclos de 30 segundos a 95 $^{\circ}$  C; 30 segundos a 42 $^{\circ}$  C e 45 segundos de 72 $^{\circ}$  C, com acréscimo de 20 segundos por ciclo; e, finalmente, a etapa de extensão a 72 $^{\circ}$  C durante 7 minutos.

O produto recombinado pela técnica *DNA shuffling*, representando uma população de genes variantes contendo o tamanho dos genes originais, foi digerido com a enzima de restrição *Sfi I* e inserido no fagomídeo pComb3XSS (Rader & Barbas III, 2000), contendo extremidades também flanqueadas em *Sfi I*. Esta construção foi utilizada na transformação que originou a biblioteca combinatória de mutantes para  $\lambda$  Als.



**Figura 1:** Representação esquemática das etapas da técnica de DNA *shuffling*.

### Seleção *in vitro* de novas moléculas de $\square$ AIs

#### Construção da biblioteca combinatória de $\square$ AIs

Para a reação de ligação, foram utilizados 3 $\mu$ g do inserto (população de genes recombinados purificados do gel de agarose) para 1 $\mu$ g do vetor (pComb3XSS), 10U da enzima T4 DNA ligase para um volume final de 200 $\mu$ L. O DNA precipitado com 1/10 de acetato de sódio 3M e 1V de etanol foi lavado com etanol 70% gelado, liofilizado e ressuscitado em 15 $\mu$ L de água. Esse DNA foi utilizado para transformar células de *E. coli*, linhagem XL-1 Blue (competência de 10<sup>8</sup> u.f.c.), via eletroporação. O material eletroporado foi recolhido da cubeta com meio SOC (Barbas III *et al.*, 2001), totalizando 15mL de cultura de células transformadas. Uma alíquota dessa cultura foi reservada para plaqueamento em meio sólido com antibióticos, utilizando-se várias diluições. A titulação das colônias indicou o tamanho da biblioteca. Aos 15mL de cultura foram adicionados 30mL de meio SB (MOPS 1%, triptona 3%, extrato de levedura 2%, pH 7.0) pré-aquecido a 37° C; e os antibióticos, 9 $\mu$ L de carbenicilina 100mg/mL e 90 $\mu$ L de tetraciclina 5mg/mL. Essa cultura foi incubada a 37° C durante 1 hora, sob agitação (250rpm). Em seguida, essas células foram infectadas com fago auxiliar VCSM13 (10<sup>11</sup> u.f.c./mL) e incubadas durante, pelo menos, 16 horas, sob agitação, a 37° C. A cada ciclo, após a precipitação com PEG/NaCl (PEG 8000 20%; NaCl 2,5M), a solução de fagos dissolvidos em TBS contendo 1% de BSA foi utilizada na seleção de fagos específicos de acordo com a afinidade pela enzima ZSA.

#### Seleção *in vitro* de mutantes de $\square$ AIs com afinidade pela enzima ZSA(*Biopanning*)

Na etapa inicial de seleção, dois poços de uma placa de microtitulação foram incubados com 20 $\mu$ g de extrato protéico de intestino de *Z. subfasciatus* durante 16 horas a 4° C, seguido de 1 hora a 37° C. Após essa etapa de sensibilização, o procedimento de seleção seguiu como descrito por Barbas III *et al.* (2001). A seleção (*biopanning*) consistiu

de vários ciclos repetidos de ligação e eluição dos fagos, apresentando em sua superfície mutantes de  $\lambda$  Als.

### **Teste de “Fago-Elisa”**

Ao término do *biopanning*, a população de fagos recuperados de cada ciclo foi titulada pelo teste de Elisa para a análise e escolha do ciclo que melhor representa a população de fagos específicos.

Em uma placa de microtitulação, foram sensibilizados 20 $\mu$ g da enzima ZSA por incubação a 37° C durante 2 horas. Posteriormente, os poços da placa foram bloqueados com solução BSA (albumina de soro bovino) 3% em PBS (durante 16 horas, a 37° C), seguido de três lavagens (PBS-Tween 0,05%) e adição de 100 $\mu$ l da preparação de fagos obtida em cada ciclo de seleção. Após a incubação de 1 hora a 37° C, os poços foram lavados três vezes com PBS-Tween 0,05%. Adicionou-se o anticorpo primário,  $\lambda$  Als (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) diluído 1:100) e a placa foi incubada a 37° C durante 4 horas. Em seguida, os poços foram lavados três vezes com PBS-Tween 0,05% e incubados com o anticorpo secundário, anti-fago M13 produzido em cabra (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) (diluído 1:2500). Após 1 hora de incubação, a 37° C, os poços foram finalmente lavados três vezes com PBS-Tween 0,05%. Para a revelação, utilizou-se pNPP (p-nitrophenil fosfato - Sigma) 1mg/mL dissolvido em solução APB (5mM de cloreto de magnésio, 100mM de Tris-HCl, pH 9.5 e 100mM de cloreto de sódio) e a absorbância foi medida em 405nm.

### **Dot Blot para análise da expressão das proteínas recombinantes**

O DNA extraído do precipitado de bactérias dos ciclos que apresentaram maior enriquecimento de fagos específicos foi utilizado para transformar células de *E. coli*, linhagem Top 10 F', via choque térmico. Noventa e cinco clones provenientes de cada ciclo, escolhidos aleatoriamente, foram crescidos em meio 2xYT (extrato de levedura 1%; peptona 1,6%; NaCl 1%; pH 7.0) contendo glicose 0,5% e ampicilina 100 $\mu$ g/mL, e induzidos com 1mM de IPTG (Isopropil  $\beta$ -D-thiogalactosidase). Cinco microlitros do sobrenadante do cultivo de cada clone foram colocados sobre uma membrana de nitrocelulose. A membrana foi bloqueada em solução de BSA 3% em PBS e incubada com o anticorpo anti-HA IgG produzido em coelho (Santa Cruz Biotechnology) – diluído na proporção de 1:1500 em PBS – durante 3 horas, a 37° C. Após três lavagens rápidas com PBS-Tween 0,05%, incubou-se o anticorpo secundário, anti-IgG de coelho produzido em cabra e conjugado com fosfatase alcalina (diluído 1:3000), durante 2 horas a temperatura ambiente. A membrana foi rapidamente lavada por três vezes com PBS-Tween 0,05% e a detecção foi realizada utilizando o substrato NBT (Nitro Blue Tetrazole), BCIP (5-Bromo-4-Chloroindolil-fosfato® - Roche).

Para verificar a integridade dos genes, os clones detectados no *Dot Blot* foram analisados via PCR. A seqüência de nucleotídeos dos clones apresentando amplificação no tamanho original do gene (660pb) foi determinada por seqüenciamento automático.

#### Análise de seqüência dos genes selecionados

As seqüências nucleotídicas e as seqüências protéicas traduzidas foram alinhadas pelo programa Clustal W (<http://www.expasy.org>). As seqüências dos mutantes foram comparadas com as seqüências originais dos inibidores  $\alpha$ -AI1 e  $\alpha$ -AI2.

#### Clonagem dos mutantes de $\alpha$ -AIs em vetor para expressão em plantas

Os genes contendo o maior número de mutações foram isolados de seus fagomídeos por meio de PCR e de iniciadores contendo as seqüências de sítio de restrição (*Xma* I e *Sac* I) e do peptídeo sinal do inibidor de  $\alpha$  AI (tabela 1). O produto da PCR foi purificado e inserido em vetor de expressão em planta.

**Tabela 1:** Seqüência dos iniciadores XMAPSAI1, AI1SAC1 e AI2SAC1, utilizados para subclonagem de genes para mutantes em vetor de planta.

Iniciadores	Seqüência
XMAPSAI1 - <i>sense</i>	5' CCC <b>CCC GGG</b> ATG GCT TCC TCC AAC TTA CTC TCC CTA GCC CTC TTCCTT GTG CTT CTC AAC CAC GCA AAC TCA <b>GCC ACC GAA</b> <b>ACC TCC</b> 3'
AI1SAC1 – <i>anti-sense</i>	5' CCC <b>GAG CTC</b> TTA <b>GAG GAT CTT GTT GAG GAC</b> 3'
AI2SAC1 – <i>anti-sense</i>	5' CCC <b>GAG CTC</b> TTA <b>GAG GAT ATT GTT GAG</b> <b>GAG</b> 3'

A seqüência em vermelho se refere ao sítio de restrição da enzima; em verde à seqüência do peptídeo sinal do  $\alpha$  AI; e em azul à seqüência que se anela ao gene.

O vetor utilizado foi o pCambia 2300 (série pCambia Cambia, Canberra, Austrália) modificado previamente, contendo o promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor duplicado (CaMV35Sd), o enrançer do vírus do mosaico da alfafa (AMV) e o terminador-NOS.

Os genes para mutantes de  $\alpha$ -AIs, assim como o plasmídeo pCambia 2300 modificado, foram digeridos com as enzimas de restrição *Xma* I e *Sac* I. A reação para ligação do inserto no vetor envolveu 30ng do inserto, 100ng do plasmídeo, uma unidade da enzima

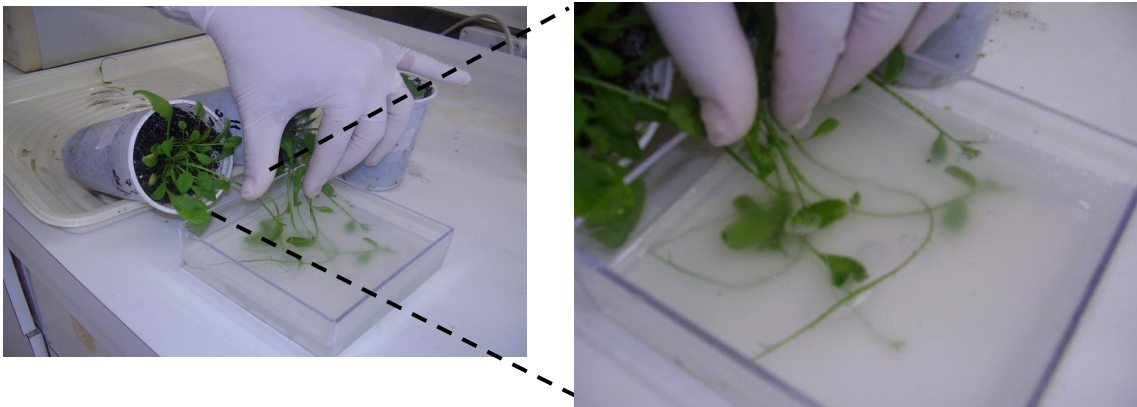
T4 DNA ligase e 1X de tampão da enzima. O produto da ligação foi utilizado na eletroporação de células de *E. coli* (linhagem XL-1 Blue). O DNA plasmidial de 10 colônias de cada mutante, resultante da transformação, foi analisado via PCR. As construções gênicas, após confirmação da seqüência, foram utilizadas para transformar *Agrobacterium tumefaciens*.

### **Inserção dos genes em *A. tumefaciens***

A linhagem GV3103 (pMP90) (Koncz & Schell, 1986) de *A. tumefaciens* foi transformada por choque térmico, utilizando-se 10 µg do DNA de cada vetor contendo os genes para variantes. Os transformantes foram confirmados via PCR de colônia. Um transformante de cada construção foi usado para transformar plantas de *A. thaliana*, por meio da técnica de imersão de botões florais.

### **Transformação de plantas de *A. thaliana* por meio da técnica de imersão de botões florais.**

Plantas de *A. thaliana*, ecótipo Columbia, foram utilizadas para a transformação, de acordo com o protocolo de Clough & Bent (1998). Três plantas jovens (6 a 10cm), apresentando um aspecto vigoroso e botões florais fechados, foram imersas em solução de transformação contendo 200 µL do surfatante Silwet L77 para cada litro de solução. O procedimento de infecção com a bactéria (figura 2) durou aproximadamente três minutos. As sementes maduras foram coletadas três semanas após a inoculação.



**Figura 2:** Ilustração da imersão dos botões florais no meio de infecção com cultivo de bactéria (Fonte: Cruz, C.C.M., 2005, com autorização do autor).

### **Seleção dos transformantes de *A. thaliana***

Para a análise dos transformantes, as sementes esterilizadas foram espalhadas em placas de Petri contendo meio MS diluído 1:4, 0,8% de ágar e 100 µg de canamicina. As plântulas

resistentes a canamicina foram transferidas para o substrato e crescidas em casa de vegetação.

Para confirmar a presença dos genes nas plantas selecionadas em meio com canamicina, utilizou-se o DNA extraído de folhas como molde da PCR e os iniciadores descritos na tabela 1.

### **Análise das proteínas expressas nas plantas de *A. thaliana* transformadas**

#### **Análise da expressão por meio da técnica *Western Blot***

Para a obtenção do extrato protéico, três a quatro folhas de plantas – crescidas a partir da germinação de sementes T2 – foram maceradas em nitrogênio líquido e o pó ressuspenso em solução de extração (125mM de Tris HCl, pH 8.8; 0.1% de SDS; 10% de glicerol; 50mM de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Esse material foi centrifugado e o sobrenadante coletado.

Amostras de extratos protéicos, separadas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 15% (Laemmli, *et. al.*, 1970), foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Hybond C<sup>®</sup> Amersham). Essa membrana foi bloqueada com uma solução de gelatina 3% em TBS, durante 16 horas; em seguida, foi incubada durante duas horas com o anticorpo anti- $\beta$  All produzido em coelho (diluído 1:700 em TBS), a temperatura ambiente, sob agitação. Após três lavagens com TBS-Tween 0.02%, foi adicionado o anticorpo secundário IgG HRP (Bio Rad) produzido em coelho (diluído 1:1000 em gelatina 1% em TBS) com incubação durante 2 horas, sob leve agitação, a temperatura ambiente. A membrana foi novamente lavada como descrito acima e as proteínas foram detectadas após a adição da solução de revelação (Solução A: 3mL de metanol gelado e 9mg de HRP – Horsedish peroxidase conjugates; Solução B: 15mL de TBS e 12 $\mu$  L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

#### **Análise de expressão por meio do teste de Elisa**

Os poços da placa de microtitulação foram sensibilizados com 150 $\mu$  g de cada extrato protéico, durante 2 horas, a 37° C. Seguiram-se quatro lavagens com solução contendo 0,3% de leite em pó, 0,05% de Tween-20 e 10% de PBS 10X. Posteriormente, adicionou-se solução bloqueadora (3% de leite em pó; 0,4% de EDTA 0,5M; 0,05 $\mu$  L de Tween-20; e 100% de PBS 1X, pH 8.0) incubando a 4° C durante 16 horas, com acréscimo de 1 hora, a 37° C. A solução de bloqueio foi descartada e os poços novamente lavados. Adicionou-se o anticorpo anti- $\beta$  All produzido em coelho (diluído 1:750 em PBS 1X) e a placa foi incubada a 37° C durante 2 horas. Após quatro lavagens com a solução descrita acima, incubou-se o anticorpo secundário conjugado com fosfatase alcalina produzido em coelho (diluído 1:5000 em PBS 1X), a 37° C, durante 2 horas. Depois da retirada do anticorpo e lavagens, a reação foi concluída com adição de solução de revelação (1mg/mL de pNPP dissolvido em solução contendo 24,25mL de dietanolamina para 250mL de água, pH 9.8). Após 45 minutos de reação, a absorbância foi medida em 405nm.

### **Análise de atividade inibitória *in vitro***

Plantas crescidas a partir da germinação de sementes T2 foram maceradas em nitrogênio líquido e as proteínas extraídas com tampão (125mM de Tris HCl pH 8.8, 0,01% de SDS, 10% de Glicerol e 50mM de metabisulfito de sódio), na proporção de 1:1,5. O material foi centrifugado e o sobrenadante coletado.

Para a detecção da atividade inibitória, foram feitos ensaios de atividade *in vitro*, utilizando-se o método de DNS (ácido dinitrosalicílico) descrito por Bernfeld (1955). Foram utilizados 100 µg de extrato protéico da planta de *Arabidopsis*. Determinou-se previamente o pH ótimo para a reação de cada uma das enzimas utilizadas nos testes.

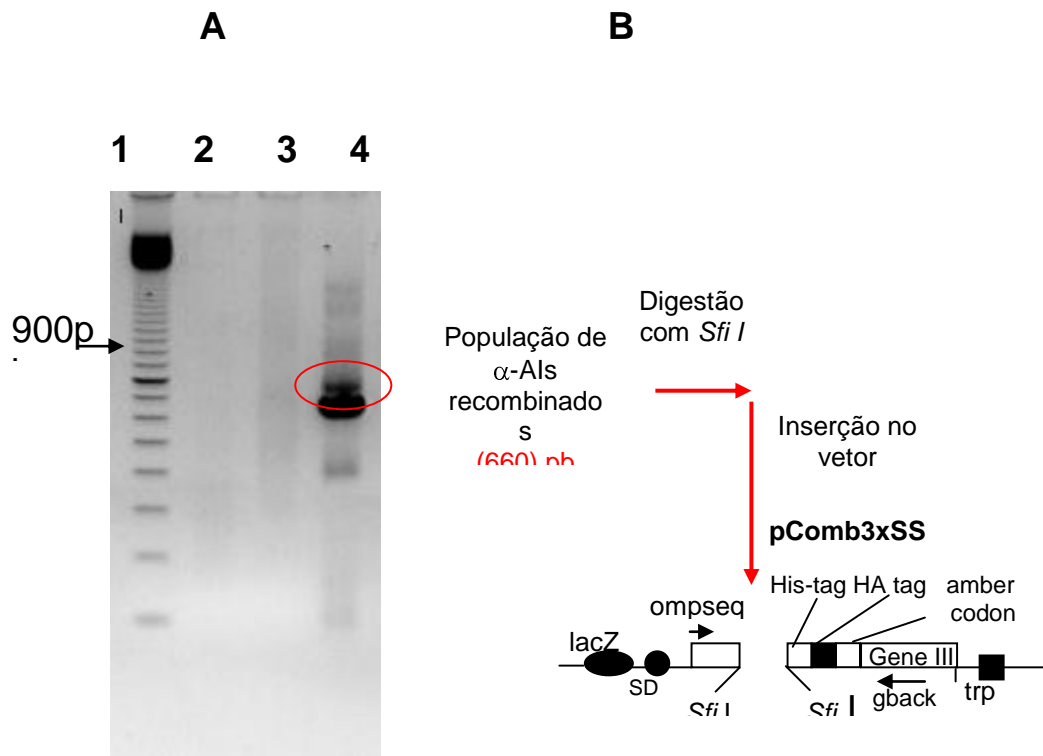
## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Aplicação da técnica DNA *shuffling* para a obtenção de mutantes de α-Als**

Neste trabalho aplicou-se o método básico de DNA *shuffling* proposto por Stemmer (1994), com modificações sugeridas por Zhao & Arnold (1997). No entanto, encontram-se relatos de inúmeras variações para o método, aplicadas a diferentes objetivos (Silva *et al*, 2003 e Neylon, 2004 para revisão; Kashinagi *et al*, 2006).

Os genes α-*A11* e α-*A12* foram combinados e fragmentados pela enzima *DNase I*. A figura 3A se refere às análises dos produtos obtidos em cada etapa da técnica DNA *shuffling* e a representação esquemática para a construção do fagomídeo utilizado para a produção da biblioteca combinatória de αAls. A digestão enzimática resultou em fragmentos com tamanho variando de 30 a 300pb (figura 3A, retângulo pontilhado), que foram purificados do gel de agarose e utilizados com função de iniciadores em uma reação de PCR. A PCR seguinte, na qual se utilizou o produto recombinado na primeira PCR como molde, mais a adição de oligonucleotídeos específicos, resultou na amplificação de uma banda do tamanho dos genes α Als originais (660pb). O DNA resultante da purificação dessa banda, representando uma população de genes para variantes, foi clonado no fagomídeo pComb3XSS (figura 3B). Essa construção deu origem a uma biblioteca do tipo *Phage Display* contendo  $3,14 \times 10^7$  formas variantes, apresentados na superfície de fagos.





**Figura 3.** Análise do produto de *DNA shuffling* e esquema ilustrativo da subclonagem desse produto em fagomídeo utilizado para obtenção da biblioteca combinatória **A)** Etapas da técnica *DNA shuffling* analisada em eletroforese de gel de agarose 2%: Colunas: 1, massa molecular 100pb; 2, mistura 1:1 de  $\alpha$ -AIs após digestão com *DNase I* (retângulo pontilhado); 3, produto da amplificação utilizando fragmentos digeridos e PCR sem adição de oligonucleotídeos; 4, produto da segunda PCR contendo o tamanho correspondente aos genes originais. **B)** Esquema da estratégia para a inserção do produto de genes recombinados no fagomídeo que foi utilizado para gerar a biblioteca combinatória.

### Seleção de mutantes de $\alpha$ -AIs que apresentam afinidade pela enzima ZSA

A tecnologia de seleção de biomoléculas por *Phage display* possibilita que moléculas mais efetivas sejam disponibilizadas e utilizadas no controle de pragas e patógenos em programas de melhoramento de culturas com importância agro-econômica.

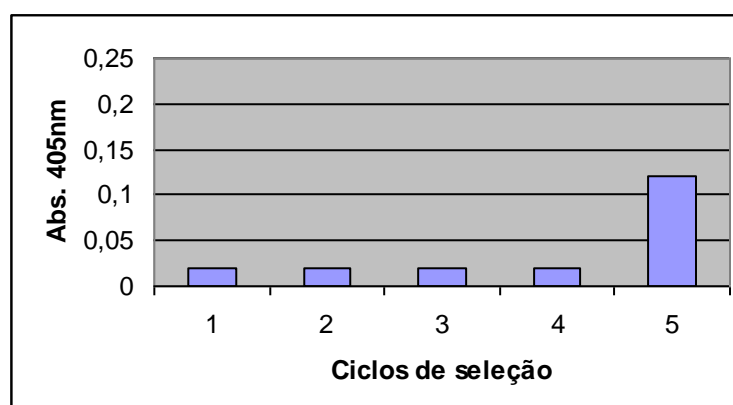
No presente trabalho, os fagos filamentosos que apresentam em sua superfície diferentes formas de inibidores de  $\alpha$ -AIs foram selecionados quanto à sua capacidade de ligação (afinidade) com a enzima de ZSA. Foram realizados seis ciclos de seleção para posterior

análise do ciclo representativo de enriquecimento de fagos específicos, os quais contêm mutantes de inibidores de  $\alpha$ -amilases que apresentam afinidade com a enzima ZSA. A tabela 2 resume o número de lavagens em cada ciclo – necessárias para a eliminação de fagos não específicos – e o número de colônias retiradas, amplificadas e recolocadas em cada ciclo. Os dados desta tabela indicam que no ciclo 2 houve um aumento na população de fagos específicos (título de saída) quando comparado com o ciclo anterior. A quantidade dos fagos de entrada, os quais entram em contato com a enzima de ZSA em cada ciclo, manteve-se constante.

**Tabela 2.** Monitoramento de enriquecimento de fagos específicos durante a seleção por afinidade a ZSA.

Ciclo	Nº. de lavagens	Título de Entrada	Título de Saída
0	5x	$10^{12}$	$10^4$
1	5x	$10^{10}$	$10^4$
<b>2</b>	6x	<b><math>10^{11}</math></b>	<b><math>10^6</math></b>
3	8x	$10^{12}$	$10^6$
4	10x	$10^{13}$	$10^4$
5	13x	$10^{12}$	$10^5$

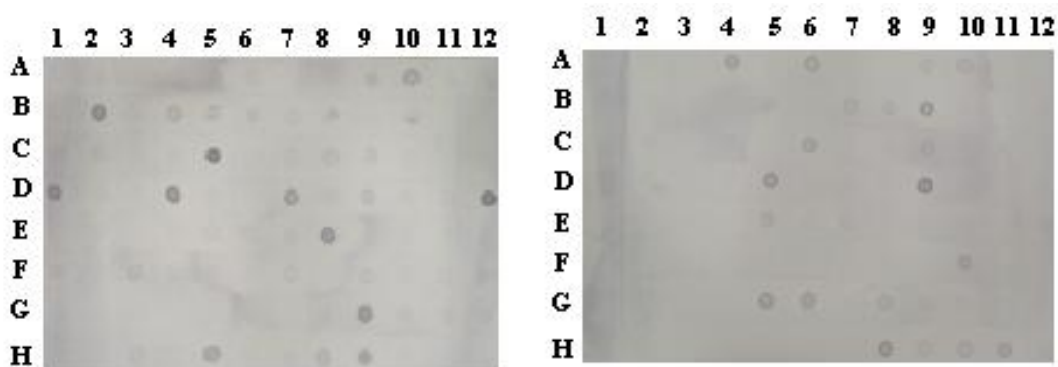
Para escolha do ciclo que melhor representa a população de fagos específicos, foram considerados os resultados dos dois métodos de monitoramento: a titulação de fagos específicos e o teste Fago-Elisa. Portanto, o ciclo 2 (tabela 2) e o ciclo 5 (mostrando a maior titulação no teste Fago-Elisa - figura 4) foram escolhidos. Os clones coletados nestes ciclos foram individualizados e os DNAs analisados.



**Figura 4.** Titulação do teste Fago-Elisa utilizando fagos coletados em cada ciclo da seleção. Para detecção do ciclo apresentando maior enriquecimento de fagos específicos foi utilizado o anticorpo anti-fago M13.

## Ensaio de *Dot Blot* dos mutantes de $\beta$ -AIs

Cento e noventa clones, provenientes da transformação da bactéria (linhagem Top 10 F') com DNAs extraídos dos precipitados dos ciclos de seleção 2 e 5, foram escolhidos aleatoriamente e, após a indução, a expressão das proteínas recombinantes foi confirmada em imunoenaios (*dot-blots* - figura 5). O sinal de expressão, identificado por comparação visual com os sinais obtidos nos controles positivo (círculo azul) e negativo (círculo verde), indicou a presença da proteína recombinante em 38 dos 192 cultivos analisados. Em 20 clones a integridade do gene foi confirmada após a análise do produto da PCR, e suas seqüências nucleotídicas foram determinadas.



**Figura 5.** Análise em imunodots do produto de expressão dos clones isolados dos ciclos seleção 2 e 5. As colunas de 1 a 6 se referem a clones coletados (círculo vermelho) após o segundo ciclo, e as colunas de 7 a 12 se referem a clones coletados após o quinto ciclo. As posições 5H e 6H (foto à esquerda) representam controle positivo (círculo em azul - proteína recombinante com expressão conhecida) e controle negativo (círculo em verde - cultivo de fago auxiliar), respectivamente.

## Análise das seqüências dos mutantes de $\beta$ -AIs

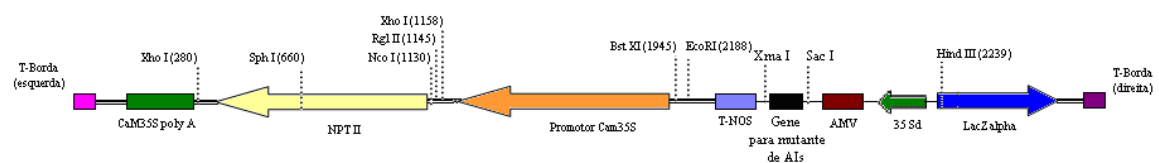
A comparação entre as seqüências nucleotídicas e as seqüências traduzidas com as seqüências dos genes originais dos inibidores  $\beta$ -AI1 e  $\beta$ -AI2 possibilitou a identificação de 11 genes, sendo que cada um deles apresentou um perfil de recombinação diferente (ou mutação). Esses genes apresentaram regiões alternadas de ambos os inibidores, mas existe a predominância na seqüência de aminoácidos correspondente ao inibidor  $\beta$ -AI1 (figura 6).



**Figura 6.** Representação esquemática das mutações encontradas nas seqüências protéicas de alguns dos mutantes selecionados contra a enzima ZSA.

### Clonagem dos mutantes de $\beta$ -AIs em vetor de expressão em plantas

Os inibidores  $\beta$ -AI1 e  $\beta$ -AI2 são processados para a forma ativa após modificações pós-traducionais, como clivagem proteolítica e glicosilações (Young *et al.*, 1995, 1999; Prescott *et al.*, 2005). Apesar de vários estudos relatarem a seleção de moléculas ativas na superfície de fagos (Volpicella, *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2002), no presente estudo os genes para variantes não são expressos para a forma ativa, quando em bactéria. Para garantir a expressão de proteínas ativas, os genes selecionados da biblioteca combinatória foram isolados do fagomídeo pComb3X e inseridos em vetor de expressão em plantas. Os DNAs para variantes contendo 740pb (correspondendo ao tamanho dos genes acrescidos de sítios de restrição e do peptídeo sinal do  $\beta$  AI1), foram extraídos do gel de agarose, digeridos com as enzimas *Xma* I e *Sac* I e inseridos no vetor pCambia 2300 modificado, originando a construção esquematizada na figura 7.



**Figura 7.** Representação esquemática do vetor construído para transformar plantas de *A. thaliana*. Os genes para mutantes de AIs foram subclonados entre os sítios de restrição *Xma* I e *Sac* I sobre controle do promotor 35Ssd e presença do enhancer AMV.

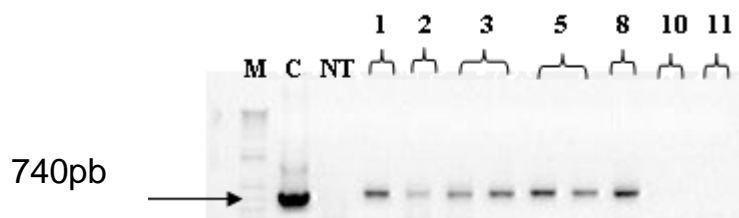
### Transformação de plantas de *A. thaliana* via imersão de botões florais utilizando *A. tumefaciens*

Os transformantes positivos, ou seja, plântulas resistentes a canamicina e contendo 2 a 3 folhas verdadeiras (figura 8), foram transplantadas para o substrato e mantidas em casa de vegetação.



**Figura 8.** Germinação das sementes da planta T1 de *A. thaliana* submetida à transformação com os genes mutantes de  $\beta$  Als. A seta indica um transformante positivo (resistente ao meio seletivo contendo 100 µg de canamicina) que foi transferido para o solo e, posteriormente, analisado via PCR.

A figura 9 mostra o resultado dos produtos da PCR de algumas das plantas submetidas à transformação. A presença do gene foi confirmada pela amplificação da banda de 720 bp na maioria das plantas analisadas.



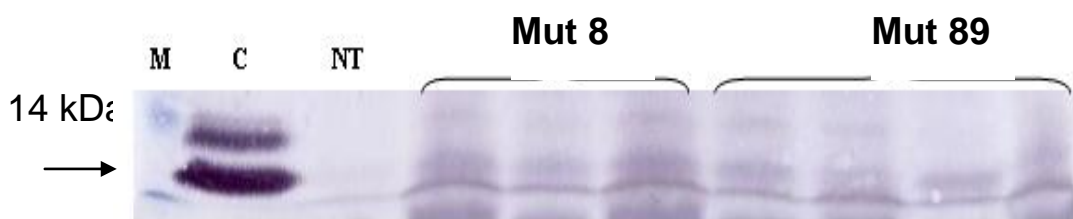
**Figura 9.** Análise de transformantes via PCR com o uso de algumas das plantas germinadas no meio seletivo (colunas 1, 2, 3, 5 e 8). Utilizou-se DNA de folhas para confirmação da presença do inserto (740pb) visualizado em gel de agarose 0.8%. M = massa molecular; C = controle positivo utilizando DNA plasmidial e NT = DNA isolado de uma planta não transformada. As plantas referentes às colunas 10 e 11 não apresentaram amplificação na PCR e, portanto, foram consideradas escape da seleção.

A taxa de transformantes de *A. thaliana* obtida da razão entre o número de sementes plaqueadas e o número de plântulas resistentes ao meio com canamicina e confirmadas por PCR para a presença do gene – variou de 0,02 a 0,7, dependendo da construção analisada. Os valores obtidos para as taxas de transformação se encontram dentro do

índice citado no método original (0.5 a 3%) descrito por Clough & Bent (1998). No entanto, no presente estudo, as plantas de *Arabidopsis* foram crescidas em casa de vegetação, sem controle de temperatura, umidade e luminosidade. Este fato pode ter influenciado o desenvolvimento destas plantas e conseqüentemente, a taxa de transformação. Além disso, o estágio de desenvolvimento em que as plantas apresentam inúmeros botões florais ainda fechados, e a concentração de Silwet L-77 utilizada são fatores importantes para o sucesso da transformação de *A. thaliana*. Nos experimentos aqui realizados, o número de botões florais variou em cada planta. A concentração utilizada do surfatante (200 µl/L) se encontra dentro da faixa (0.02% a 0.1%) indicada por Clough & Bent (1998); porém, uma concentração maior do surfatante nos próximos experimentos, poderá induzir maior número de transformantes.

#### **Análises da expressão de proteínas em plantas: *Western Blot* e Elisa**

A análise via *Western Blot* permitiu detectar a presença de proteínas com aproximadamente 14kDa, em plantas T2 transformadas com os genes para mutantes de  $\alpha$  Als, o que corresponde ao tamanho esperado para os inibidores de  $\alpha$ -amilases (figura 10).



**Figura 10.** Ilustração da análise de *Western Blot* de proteínas expressas em plantas de *A. thaliana* (T2) contendo alguns dos genes mutantes para  $\alpha$  Als. M = massa molecular, C = controle positivo utilizando o inibidor  $\alpha$  A2 purificado de *P. vulgaris* e NT = extrato protéico de folhas de planta de *A. thaliana* não transformada.

Os resultados preliminares dos ensaios de Elisa com o extrato bruto indicaram um nível de expressão das proteínas variando de 0,04 a 0,3% nas plantas analisadas. Da mesma forma como discutido acima, em relação aos resultados obtidos para a taxa de transformação de plantas, sugere-se que a ausência de condições controladas (temperatura, umidade e luminosidade) para o desenvolvimento das plantas transformadas possa ter influenciado o nível de expressão de proteínas recombinantes.

#### **Análise *in vitro* de atividade inibitória para os mutantes selecionados**

Os extratos protéicos das plantas contendo os variantes de  $\alpha$ -amilases foram testados *in vitro* para determinação da atividade inibitória. A tabela 3 apresenta os resultados de

inibição contra as  $\alpha$ -amilases de mamíferos (PPA) e dos *bruquídeos* *Z. subfasciatus* e *A. obtectus*. O ensaio de atividade inibitória foi realizado em triplicata. É importante frisar que os índices de atividade se referem ao extrato bruto (100  $\mu$ g de extrato protéico da planta transformada com os genes variantes). Quando purificados e testados, os inibidores poderão apresentar um índice maior de inibição. Os mutantes obtidos por meio da técnica DNA *shuffling* apresentam diferentes níveis de inibição para as três amilases utilizadas no ensaio de atividade *in vitro*. Vários mutantes apresentaram atividade contra a enzima AOA, atividade inexistente nos inibidores originais ( $\alpha$  AI e  $\alpha$  A2).

**Tabela 3** – Taxa de atividade inibitória *in vitro* utilizando extratos protéicos de plantas transformadas com alguns dos genes variantes para inibidores de  $\alpha$ -amilases, testado contra as  $\alpha$ -amilases dos bruquídeos e contra a  $\alpha$ -amilase de mamífero.

Genes	(% Inibição enzimática)		
	PPA	ZSA	AOA
$\alpha$ AI-1	100	0	0
$\alpha$ AI-2	0	98	0
mut 8	44	62	49
mut 19	63	33	29
mut 24	51	59	60
mut 52(R5)	0	44	0
mut 66	58	21	35
mut 89	43	46	59

## CONCLUSÃO

A estratégia aqui utilizada, que combinou as técnicas DNA *shuffling* e *Phage display* demonstrou ser eficiente para a geração e seleção de novas moléculas com diferentes especificidades dos inibidores originais  $\alpha$  AI e  $\alpha$  A2, isolados de feijão. A biblioteca combinatória gerada representa uma importante ferramenta biotecnológica e poderá ser utilizada na seleção de outros genes com potencial aplicação no controle de insetos-praga de importância econômica para a agricultura nacional.

## PERSPECTIVAS

Dando continuidade ao trabalho, os mutantes selecionados serão caracterizados quanto à atividade inibitória *in vivo* por meio de inserção do extrato bruto ou purificado em sementes

artificiais oferecidas como alimentação para os insetos bruquídeos. Os resultados dos bioensaios contribuirão para a confirmação dos diferentes índices de atividade inibitória e especificidade dos novos inibidores contra as  $\alpha$ -amilases dos bruquídeos alvo. Estudos de modelagem molecular para as novas moléculas contribuirão com informações adicionais para a elucidação dos mecanismos envolvendo especificidade (interações entre os inibidores de plantas e as  $\alpha$ -amilases de insetos). Dessa forma, os dados obtidos com estes estudos poderão, no futuro, auxiliar na síntese de moléculas mais efetivas e específicas para determinado inseto-praga ou patógeno de interesse para a agricultura.

## REFERÊNCIAS

Barbas III, C.F.; Buston, D.R.; Scott, J.K.; Silverman, G.J. 2001. Selection from Antibody Libraries. *In: Phage Display a Laboratory Manual*. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, USA, p. 10.1-10.20.

Bent, A. F. 2000. Arabidopsis in planta transformation: Uses, mechanisms, and prospects for transformation of other species [invited Update for special issue on Arabidopsis. **Plant Physiology** v.124, p.1540-1547.

Bernfeld, P. 1995. Amylases, alpha and beta. In **Methods Enzimology**. Colowick, S. P.; Kaplan, N.O., eds. Academic Press, N.Y.

Bompard-Gilles, C.; Rousseau, P.; Rougea, P.; Payan, F. 1996. Substrate mimicry in the active centre of a mammalian  $\alpha$ -amylase: structural analysis of an enzyme inhibitor complex. **Structure**, v.4, p. 1441-1452.

Bradford, M.M. 1976. 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.

Campos, F.A.P.; Xavier-Filho, J.O.; Silva, C.P.; Ary, M. B. 1989. Resolution and partial characterization of proteinases and alpha-amylases from midguts of larvae of the bruchid beetle *Callosobruchus maculatus* (F.). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 92(B), p. 51-57.

Cardona, C.; Kornegay, J.; Posso, C.E.; Morales, F.; Ramirez, H. 1990. Comparative values of four arcelin variants in the development of dry bean lines resistant to the Mexican bean weevil. **Entomological Experimental and Application**, v.56, p.197-206.

Carlini, C.R., Grossi De Sa, M.F. (2002). Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities of bioinsecticides. **Toxicon**, v. 40, n. 11, p. 1515-1539.

Ceci, L. R.; Volpicella, M.; Rahbe, Y.; Gallerani, R.; Beekwilder, J.; Jongsma, M. A. 2003. Selection by phage display of a variant mustard trypsin inhibitor toxic against aphids. **Journal Plant**, v. 33, p. 557-566.

Chen, Y.; Diener, K.; Patel, I.R.; Kawooya, J.K.; Martin, G.A.; Yamdagni, P.; Zhang, X.; Sandrasagra, A.; Sahasrabudhe, S.; Busch, S.J. 2002. Phage Display of Functional Human TNF- $\alpha$  Converting Enzyme Catalytic Domain: A Rapid Method for the Production of Stabilized Proteolytic Proteins for Assay Development and High-Throughput Screening. **The Society for Biomolecular Screening**, v. 7, n.5, p. 433-440.



Chrispells, M. J.; Raikhel, N. V. 1991. Lectins, lectins genes and their role in plant defense. **Plant Cell**, v. 3, p. 1-19.

Clough, S. J.; Bent, A. F. 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium* - mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Journal**, v.16, p. 735-743.

CONAB, disponível em <http://www.conab.gov.br> acessado em Março de 2007..

Cruz, C. C. M., 2005. Introdução de genes para inibidores de  $\alpha$ -amilases em plantas de *Arabidopsis thaliana* visando avaliação da atividade sobre o inseto praga *Anthonomus grandis*. Monografia – Faculdades Integradas da Terra de Brasília, 29pp.

Ehrlich, P.R.; Raven, P.H. 1964. Butterflies and plants: a study in co-evolution. **Evolution**, v.1, p.18.755.

Embrapa Arroz e Feijão, disponível em <http://www.cnpaf.embrapa.br> acessado em Março de 2007.

Franco, O.L.; Ridgen, D.J.; Melo, F.; Grossi-de-Sá, M.F., 2002. Plant  $\alpha$ -amylase inhibitors and their interaction with insect  $\alpha$ -amilases. **European Journal of Biochemistry**, New York, v. 269, P. 1-17.

Garcia-Maroto, F.; Carbonero, P.; Garcia-Olmedo, F. 1991. Site-direct mutagenesis and expression in *Escherichia coli* of WMAI-1, a wheat monomeric inhibitor of insect  $\beta$ -amylase. **Plant Molecular Biology**, v. 17, p. 1005-1011,.

Grossi de Sá, M.F.; Mirkov, T.E.; Ishimoto, M.; Colucci, G.; Bateman, K.S.; Chrispeels, M.J. 1997. Molecular characterization of a bean  $\beta$ -amylase inhibitor that inhibits the  $\beta$ -amylase of the Mexican bean weevil *Zabrotes subfasciatus*. **Planta**, v. 203, p. 295-303.

Ishimoto M.; Kitamura K. 1989. Growth inhibitory effects of an  $\beta$ -amylase inhibitor from kidney bean, *Phaseolus vulgaris* (L.) on three species of bruchids (Coleoptera: Bruchidae). **Applied Entomology and Zoology**, v.24, p. 281-286.

Kashiwagi, K.; Isogai, Y.; Nishiguchi, K.; Shiba, K. 2006. Frame Shuffling: a novel method for in vitro protein evolution. **Protein Engineering, Design & Selection**, v. 19, n. 3, 135-140.

Koncz, C.; Schell, J. 1986. The promoter of T-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. **Molecular and General Genetics**, v.204, p.383-396.

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

Mello, M. O.; Silva-Filho, M. C. 2002. Plant-insect interactions: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. **Plant Physiology**, v.14, n.2, p. 71-81.

Neylon ,C. 2004. Chemical and biochemical strategies for the randomization of protein encoding DNA sequences: library construction methods for directed evolution. **Nucleic Acids Research**, v.32, n.4, p. 1448-1459.

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. 2003. Molecular Cloning of  $\beta$ -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.11, p. 77-87.

Prescott, V. E.; Campbell, P. M.; Moore, A.; Mattes, J.; Rothenberg, M. E.; Foster, P. S.; Higgins, T. J. V.; Hogan, S. P. 2005. Transgenic expression of bean  $\alpha$ -amylase inhibitor in peas results in altered structure and immunogenicity. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v.53, p. 9023-9030.

Rader, C. S. P.; Barbas III, C.F. 2000. Selection from antibody libraries In: *Phage Display Laboratory Manual* (Barbas III, C.F., Burton, D.R., Scott, J.K. and Silverman, G.J., eds.).

Ryan, C.A. 1990. Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v.28, p.425-449.

Sales, M.; Gerhardt, I.I.; Grossi de Sa, M.F. Xavier Filho, J. (2000). Do Legume Storage proteins play a role in defending seeds against bruchids? Review - **Plant Physiology**, v. 142, n. 2, p. 515-522.

Silva, M. C. M.; Grossi de Sá, M. F.; Chrispeels, M. J.; Togawa, R. C.; Neshich, G., 2000. Analysis of structural and physico-chemical parameters involved in the specificity of binding between  $\alpha$ -amylase and their inhibitors. **Protein Engineering**, v. 13, p. 167–177.

Silva, M. C. M.. Figueira, E. L. Z.. Grossi de Sá, M. F. 2003. A metodologia de DNA Shuffling na produção de diversidade gênica. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, ISSN 0102-0110, n. 108, 30p.

Silva, M. C. M.; Mello, L.V.; Coutinho, M. V.; Ridgen, D. J.; Neshich, G.; Chrispeels, M. J.; Grossi-de-Sá, M.F. 2004. Bean  $\alpha$ -amylase inhibitors mutants to investigate specificity of binding to  $\alpha$ -amilases, **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, p. 201-208.

Stemmer, W. P. C., 1994. *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.

Volpicella, M.; Ceci, L.R.; Gallerani, R.; Jongasma, M.A.; Beekwilder, J. 2001. Functional Expression on Bacteriophage of the Mustard Trypsin Inhibitor MTI-2. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.280, p. 813–817.

Young, N.M.; Watson, D.C.; Yaguchi, M.; Adar, R.; Arango, R.; Rodriguez-Arango, E.; Sharon, N.; Blay, P.K.S.; Thibault, P. 1995. C-Terminal post-translational proteolysis of plant lectins and their recombinant forms expressed in *Escherichia coli*. Characterization of 'ragged ends' by mass spectrometry. **Journal of Biological Chemistry**, v.270, p. 2563-2570.

Young, N. M.; Thibault, P.; Watson, D. C.; Chrispeels, M. J. 1999. Post-translational processing of two  $\alpha$ -amylase inhibitors and an arcelin from the common bean, *Phaseolus vulgaris*. **Febs Letters**, v. 446, p. 203–206.

Zhao, H.; Arnold, F. H., 1997. Optimization of DNA Shuffling for high fidelity recombination. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, p. 1307-1308.