

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

TOXINAS CRY: POTENCIAL USO NO CONTROLE
DA BROCA GIGANTE DA CANA-DE-AÇÚCAR
*(*Telchin licus licus*)*

JOSÉ EDILSON GOMES JÚNIOR

Brasília - DF
Fevereiro/2012

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

TOXINAS CRY: POTENCIAL USO NO CONTROLE
DA BROCA GIGANTE DA CANA-DE-AÇÚCAR
*(**Telchin licus licus**)*

José Edilson Gomes Júnior

Orientação: Dra. Maria Fátima Grossi de Sá

Co-orientação: Dra. Sônia Maria de Freitas

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular do Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília como requisito para obtenção do grau de doutor em Biologia Molecular.

Brasília - DF
Fevereiro/2012

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade de
Brasília. Acervo 998018.

G633t Gomes Júnior, José Edilson.
Toxinas cry : potencial uso no controle da broca gigante
da cana-de-açúcar (*Telchinlicuslicus*) / José Edilson
Gomes Júnior. -- 2012.
xxii, 102 f. : il. ; 30 cm.

Tese (doutorado) - Universidade de Brasília, Instituto
de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Celular,
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular, 2012.
Inclui bibliografia.
Orientação: Maria Fátima Grossi de Sá ; Co-orientação: Sônia
Maria de Freitas.

1. Pragas - Controle - Cana-de-açúcar. 2. Endotoxina.
I. Sá, Maria Fátima Grossi de. II. Freitas, Sônia Maria
de. III. Título.

CDU 577.2

BANCA EXAMINADORA

Dra. Maria Fátima Grossi de Sá (Orientadora)
EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia

Dra. Sônia Maria de Freitas (Co-orientadora)
Departamento de Biologia Celular
Universidade de Brasília UnB

Dra. Kátia Castanho Scortecci
Departamento de Biologia Celular e Genética
Universidade Federal do Rio Grande do Norte UFRN

Dr. Elíbio Leopoldo Rech Filho
EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia

Dra. Marília Santos Silva
EMBRAPA Cerrados

Dr. Antônio Américo Barbosa Viana
EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia

Dr. Osmundo Brilhante de Oliveira Neto (Suplente)
EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia

Brasília - DF
Fevereiro/2012

A Deus,

À Alessandra e ao Marcus Vinicius,

Aos meus pais Edilson e Christina,

Às minhas irmãs Germana e Daniela,

Ao meu irmão Cosme,

AGRADECIMENTOS

À Universidade de Brasília – UnB e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular, em especial à secretária Ana Hilda Tibet, por sempre estar disposta a ajudar.

À EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, por ser um centro de excelência, que me acolheu e contribuiu bastante para o desenvolvimento de minha tese.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela bolsa que me foi concedida.

À minha esposa Alessandra Gomes, por acreditar em minha capacidade, sem ela não teria vindo para Brasília. Trata-se de uma mulher ímpar, indescritível. Você é o amor de minha vida.

Ao meu filho Marcus Vinicius Gomes, o qual foi concebido e nascido durante o meu doutorado. Durante os momentos mais difíceis dessa minha caminhada, bastava um sorriso, um abraço seu, que tudo se amenizava. Papai te ama.

Aos meus pais Edilson e Christina, às minhas irmãs Germana e Daniela e ao meu irmão Cosme, por sempre meus cúmplices.

Ao meu grande amigo Djair Souza, pela sua presteza. Ele foi a ponte entre eu e o meu doutorado.

À Prof.^a Dra. Fátima Grossi, pela oportunidade que me deu, tornando-me membro de sua equipe, ainda durante o meu mestrado, no longínquo ano de 2005. Muito obrigado. Cresci bastante profissional e pessoalmente, desde a minha chegada em Brasília.

À **Dra. Cristina Mattar**, por ser a pessoa com a qual pude sempre contar. Sempre discutindo comigo os rumos a serem seguidos em minha tese. Muito obrigado mesmo.

À **Lecir Nascimento**, pela sua paciência e pela amizade, tanto quando se tratava de bolsa quanto de compra de produtos importantes para a minha pesquisa. Não esquecendo também, da **Angélica Bússolo**, que a substituiu, demonstrando grande capacidade.

Aos meus grandes amigos **Dr. Osmundo Brilhante e Dr. Antônio Américo**, pelo eterno alto astral. Vocês são as pessoas as quais sempre pude confiar, mesmo não trabalhando diretamente comigo. Além disso, sempre foram meus confidentes, nas desventuras dessa minha vida. Valeu. Vocês são os caras! Um abraço apertado em cada um de vocês!

Ao pessoal do **Laboratório de Interação Molecular Planta-Praga I**, **Leonardo Pepino e Wagner Lucena**, por terem me ajudado incisivamente em minha tese, **José Dijair, Alexandre Firmino, Isabela Tristan, Jorge Arboleda, Fernando Fonseca, Aulus Barbosa, Kilvia Craveiro, Thales Rocha, Érico Vasconcelos, Gustavo Oliveira, Magda Beneventi, André Júlio, Itamara Mezzalira, Felipe Redorat, Caroline Bezerra, Roberta Coelho, Erich Nakasu, Tiago Siqueira, Angelina Basso, José Cesamildo, Thiago Gonçalves, Diogo Sá, Vivian Miranda, Eduardo e Flávia Mulinari, Stephan Dohms, Maíra Grossi, Bruna Araújo, Hudson Ramos, Rafael Del Sarto, Cleiton Cruz, Rodrigo Fragoso, Raquel Sampaio, Sineide Rangel, Sheiska Silva, Ariane Lacerda, Vanessa Olinto, Luciane Guimarães, PH Costa**, por serem grandes colegas.

“Conta certa lenda, que estavam duas crianças patinando num lago congelado. Era uma tarde nublada e fria, e as crianças brincavam despreocupadas. De repente, o gelo quebrou e uma delas caiu, ficando presa na fenda que se formou. A outra, vendo seu amiguinho preso, e se congelando, tirou um dos patins e começou a golpear o gelo com todas as suas forças, conseguindo por fim, quebrá-lo e libertar o amigo. Quando os bombeiros chegaram e viram o que havia acontecido, perguntaram ao menino:

- Como você conseguiu fazer isso? É impossível que tenha conseguido quebrar o gelo, sendo tão pequeno e com mãos tão frágeis!

Nesse instante, um ancião que passava pelo local, comentou:

- Eu sei como ele conseguiu.

Todos perguntaram:

- Pode nos dizer como?

- É simples: - respondeu o velho.

- Não havia ninguém ao seu redor para lhe dizer que não seria capaz.”

Albert Einstein

ÍNDICE

1. Resumo.....	xix
2. Abstract.....	xxi
3. Introdução	23
3.1. Cana-de-açúcar e o agronegócio brasileiro	23
3.2. Insetos-pragas de impacto econômico na cultura canavieira	25
3.3. Melhoramento genético da cana-de-açúcar.....	28
3.4. Toxinas Cry	30
3.4.1. Aspectos gerais.....	30
3.4.2. Modo de ação	32
3.5. Biotecnologia e toxinas Cry.....	34
3.5.1. Plantas geneticamente modificadas (GM) expressando toxinas Cry	34
3.5.2. Culturas <i>Bt</i> liberadas comercialmente no Brasil	38
3.5.3. Cana-de-açúcar – Status das culturas <i>Bt</i> no Brasil	41
3.6. Produção de toxinas Cry com atividade intensificada: Evolução molecular <i>in vitro</i>	43
4. Hipótese	47

5. Objetivos.....	48
5.1. Objetivo geral.....	48
5.2. Objetivos específicos.....	48
6. Materiais e Métodos	49
6.1. Linhagem bacteriana, vetores, fagomídeo e fago auxiliar	49
6.2. Obtenção dos Insetos.....	49
6.3. Obtenção e preparação dos intestinos médios das larvas de <i>T. l. licus</i> 	49
6.4. Preparação das <i>BBMVs</i> (<i>Brush Border Membrane Vesicles</i>).....	50
6.5. Ensaio enzimáticos	50
6.6. Estirpes de <i>Bacillus thuringiensis</i>.....	51
6.7. Bioensaios contra larvas de <i>T. l. licus</i>	51
6.8. Ensaio de Permeabilidade das <i>BBMVs</i> de <i>T. l. licus</i>	51
6.9. <i>DNA Shuffling</i>.....	52
6.10. Subclonagem dos genes <i>cry1Aa</i> e <i>cry1Ia12</i> e seus variantes no fagomídeo pCOMB3X.....	54
6.11. Construção da biblioteca combinatória (tipo <i>Phage display</i>) contendo os genes para variantes <i>Cry1Aa</i> e <i>Cry1Ia12</i>	56

6.11.1. Transformação de células <i>E. coli</i> XL1-Blue, por eletroporação e construção da biblioteca combinatória.....	56
6.11.2. Seleção das variantes dos genes <i>cryIAa</i> e <i>cryIIa12</i> (<i>biopanning</i>) partindo da biblioteca combinatória	57
6.12. PCRs de colônia	59
6.13. Obtenção das toxinas CryIIa12 e das variantes selecionadas por <i>Phage display</i>	59
6.13.1. Apresentação dos genes parental e variantes na superfície de fago auxiliar VCSM13	59
6.13.2. Expressão dos genes parental e variantes em <i>E. coli</i> XL-1 Blue	60
6.14. Análise das proteínas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	60
6.15. Imunodeteção (Western Blot).....	61
6.16. Ensaio de ligação (ELISA).....	61
6.17. Sequenciamento dos DNAs	62
7. Resultados e Discussão	64
7.1. Avaliação da atividade entomotóxica de estirpes <i>Bt</i> e toxinas Cry sobre larvas de <i>T. l. licus</i>	64
7.1.1. Efeito entomotóxico das estirpes de <i>Bt</i> sor. <i>kurstaki</i> e <i>Bt</i> sor. <i>tolworthi</i> sobre larvas de <i>T. l. licus</i>	64
7.1.2. Genes <i>cry</i> recombinantes.....	66

7.1.3. Permeabilidade das BBMV's de <i>T. l. licus</i>	66
7.1.4. Efeito entomotóxico de toxinas Cry recombinantes sobre larvas de <i>T. l. licus</i>	68
7.2. Evolução molecular <i>in vitro</i> de toxinas Cry.....	68
7.2.1. Amplificação dos genes <i>cry1Aa</i> e <i>cry1Ia12</i> contendo os sítios de restrição para as enzimas <i>Sfi</i> I, <i>Bam</i> HI, <i>Sph</i> I e uma sequência âncora	69
7.2.2. Fragmentação dos genes <i>cry1Aa</i> e <i>cry1Ia12</i>	70
7.2.3. Recombinação dos genes <i>cry1Aa</i> e <i>cry1Ia12</i> variantes	71
7.3. Teste de enriquecimento das BBMV's de <i>T. l. licus</i>	72
7.4. Seleção das variantes dos genes <i>cry1Aa</i> e <i>cry1Ia12</i> por <i>Phage display</i>	73
7.5. PCRs de colônia	75
7.6. Expressão das variantes dos genes <i>cry1Ia12</i> selvagem e variantes em <i>E. coli</i> e imunodeteção por Western Blotting	77
7.7. Determinação da atividade entomotóxica das variantes Cry1Ia12 sobre larvas de <i>T. l. licus</i>	78
7.8. Ensaio de ligação da toxina Cry1Ia12 selvagem e suas variantes às BBMV's de <i>T. l. licus</i>	79
7.9. Análise de sequências das variantes <i>cry1Ia12</i> selecionadas	80
8. Conclusões	85

9. Perspectivas.....	86
10. Referências	87
11. Anexos.....	96
12. Apêndice - Artigos	102
12.1. Craveiro KIC, Gomes Júnior JE, Silva MCM, Macedo LLP, Lucena WA, Silva, MS, Antonino-Souza Júnior, JD, Oliveira, GR, Magalhães, MTQ, Santiago, AD, Grossi-de-Sá, MF. Variant CryIIa toxins generated by DNA shuffling are active against sugarcane giant borer. <i>Journal of Biotechnology</i>. 145: 215-21.	
12.2. Oliveira, GR, Silva, MCM, Lucena, WA, Nakasu, EYT, Firmino, AAP, Beneventi, MA, Souza, DSL, Gomes Júnior, JE, Antonino-Souza Júnior, JD, Rigden, DJ, Ramos, HB, Soccol, CR, Grossi-de-Sá, MF. Improving Cry8Ka toxin activity towards the cotton boll weevil (<i>Anthonomus grandis</i>). <i>BMC Biotechnology</i>. 11:85.	

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ATP	Adenosina-5'-trifosfato
BBMV	Brush border membrane vesicles
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
<i>Bt</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
EC	Enzyme Classification
ELISA	Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay
GPI	Glycoyl-phosphatidylinositol
IgG	Imunoglobulina G
IPTG	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo
Kb	Kilobases
kDa	kiloDalton
kV	Kilovolt
M	Molar
mA	Miliampere
MET	Manitol, EGTA e Tris
mg	Miligramas
mL	Mililitros
mM	Milimolar
ng	Nanogramas
nM	Nanômetro
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PEG/NaCl	Polietileno glicol / Cloreto de sódio
pfu	Plaque-forming unit
PMSF	Phenylmethyl sulphonyl fluoride
pNPP	p-Nitrophenyl Phosphate
p/v	Peso/volume
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
Sor.	Sorovariedade
TBS	Tris Buffer Salino

U	Unidades de enzima de restrição (quantidade de enzima que digere 1 μg de DNA em 1 hora em condições ótimas de pH e osmolaridade)
UR	Umidade relativa
v	Volume
V	Volts
μF	Microfarad
μg	Microgramas
μL	Microlitros
μM	Micromolar
Ω	Ohms

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principais insetos-pragas que atacam a cana-de-açúcar no Brasil.....	27
Figura 2. Sintomas de ataques à cultura da cana-de-açúcar	28
Figura 3. <i>Bacillus thuringiensis</i>	31
Figura 4. Estrutura tridimensional da toxina Cry1Aa, mostrando seus domínios	33
Figura 5. Esquema ilustrando os modelos para a ação das toxinas Cry	34
Figura 6. Padrão da adoção da biotecnologia no Brasil.....	41
Figura 7. Esquema ilustrando a recombinação <i>in vitro</i> via <i>DNA shuffling</i>	44
Figura 8. <i>Phage display</i>.....	45
Figura 9. Sequência de um oligonucleotídeo iniciador utilizado no <i>DNA shuffling</i>, mostrando a estratégia utilizada	53
Figura 10. Representação esquemática da construção do fagomídeo pCOMB3X- <i>cry11a12</i>, para expressar a Cry11a12 na superfície do fago filamentososo M13.....	55
Figura 11. Bioensaios com estirpes de <i>Bt</i> de diferentes sorovariedades contra larvas de <i>T. l. licus</i>	65
Figura 12. Eletroforese em gel de agarose 1%, mostrando os amplicons referentes aos genes <i>cry1</i> e <i>cry2</i>	66
Figura 13. Efeito de toxinas Cry na permeabilidade de BBMV's de <i>T. l. licus</i>.....	67
Figura 14. Determinação da taxa de mortalidade das larvas de <i>T. l. licus</i> em bioensaios utilizando as toxinas Cry recombinantes	68

- Figura 15.** Eletroforese em gel de agarose 1%, mostrando os produtos das PCRs, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores contendo sítios de restrição para as enzimas *Sfi* I, *Bam* HI, *Sph* I e uma sequência de DNA âncora aos genes *cry1Aa* e *cry1Ia12* 70
- Figura 16.** Eletroforese em gel de agarose 2,5%, mostrando o produto da digestão dos genes *cry1Aa* e *cry1Ia12* com a enzima DNase I (concentração de 30 U/mL).. 70
- Figura 17.** Eletroforese em gel de agarose 2,5%, indicando os fragmentos (até 125 pb) após a purificação utilizando colunas Microcon[®] YM-100 (Millipore) 71
- Figura 18.** Eletroforese em gel de agarose 0,8%, mostrando o produto da reação do *DNA shuffling* para os genes *cry1Aa* e *cry1Ia12* 71
- Figura 19.** Análise da qualidade das preparações de BBMV's obtidas das larvas de *T. l. licus* pela determinação da atividade específica das enzimas marcadoras (A) fosfatase alcalina e (B) leucina aminopeptidase..... 73
- Figura 20.** Número de colônias obtidas em cada ciclo de seleção (*biopanning*) 75
- Figura 21.** Análise em gel de agarose (0,8%) mostrando o tamanho esperado do inserto (1944 pb) após PCR de colônia 76
- Figura 22.** Análise da imunodeteção por Western Blotting do produto das expressões das toxinas CryIIa12 selvagem e variantes 77
- Figura 23.** Análise de mortalidade das larvas de *T. l. licus* causadas pelas variantes da toxina CryIIa12 em bioensaios utilizando dieta artificial 78
- Figura 24.** Especificidade de ligação das toxinas CryIIa12 selvagem e variantes às BBMV's de *T. l. licus* 80
- Figura 25.** Estrutura tridimensional da toxina CryIIa12 e as mutações encontradas nas variantes geradas por *DNA shuffling*..... 82

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Matérias-primas de biocombustíveis	24
Tabela 2. Culturas transformadas com genes <i>cry</i> visando à resistência a insetos-praga	36
Tabela 3. Cultura de soja contendo gene <i>Bt</i>, que foi liberada comercialmente no Brasil.....	39
Tabela 4. Culturas de algodão contendo genes <i>Bt</i>, que foram liberadas comercialmente no Brasil.....	39
Tabela 5. Culturas de milho contendo genes <i>Bt</i>, que foram liberadas comercialmente no Brasil.....	40
Tabela 6. Diferentes genes em estudo em cana-de-açúcar geneticamente modificada (GM)	42
Tabela 7. Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores específicos utilizados durante o <i>DNA shuffling</i>	54
Tabela 8. Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores específicos utilizados durante as PCRs de colônia	59
Tabela 9. Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores específicos utilizados para as reações de sequenciamento dos genes <i>cry</i> variantes.....	63
Tabela 10. Genes <i>cry</i> presentes nas estirpes de <i>Bt</i> sor. <i>kurstaki</i> S1905 e S2105 e <i>Bt</i> sor. <i>tolworthi</i> S135 e S62.....	66
Tabela 11. Identidade das sequências nucleotídicas entre os genes <i>cry1Aa</i>, <i>cry11a12</i> e <i>cry2Aa</i>.....	69

Tabela 12. Mutações encontradas nas toxinas Cry1Ia12 variantes	81
---	-----------

1. RESUMO

No Brasil, a cultura da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) possui grande destaque, com aproximadamente 40% da produção mundial. Apresenta estimativa de produção de 571.471,0 milhões de toneladas para a safra 2011/2012, sendo uma alternativa interessante e ecologicamente correta para a produção de fontes de energia renováveis. Embora o Brasil esteja classificado entre os líderes mundiais na produção de cana-de-açúcar, regiões como o Nordeste e o Sudeste apresentam problemas econômicos relacionados a danos causados pelo ataque de insetos-praga, destacando-se a broca gigante da cana-de-açúcar (*Telchin licus licus*) (Lep.: Castniidae) e a broca da cana-de-açúcar (*Diatraea saccharalis*) (Lep.: Crambidae), respectivamente. A dificuldade no controle dessas pragas está no fato de possuírem hábito endofítico, que impede a ação dos inseticidas químicos. Neste contexto, várias proteínas entomotóxicas têm sido descritas como potenciais candidatas para o controle de insetos-praga. As toxinas Cry ou δ -endotoxinas, secretadas pela bactéria gram-positiva *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), são moléculas efetivamente usadas no controle de insetos-praga, devido a sua especificidade e toxicidade a algumas ordens de insetos. Nesse trabalho, o objetivo é selecionar toxinas Cry eficazes contra *T. l. licus*, aplicando as técnicas de *DNA shuffling* e *Phage display*. Resultados de bioensaios utilizando cepas de *Bt* (*Bt* sor. *kurstaki* S2195 e S1905 e *Bt* sor. *tolworthi* S135 e S62) e larvas de 1º instar de *T. l. licus* indicaram alta mortalidade nos tratamentos com *Bt* sor. *kurstaki*. Os genes *cry* presentes nessa soroveriedade de *Bt* foram determinados e ensaios de dilatação osmótica baseados em espalhamento de luz, indicaram que as toxinas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ia12 e Cry2Aa foram capazes de formar poros nas BBMVs de *T. l. licus*. Em bioensaios contendo tratamentos com as mesmas toxinas Cry (1 mg/mL) e larvas de *T. l. licus* foi demonstrada efetividade, com taxa de mortalidade de aproximadamente 90%. Visando a obtenção de novas moléculas de genes *cry* através da técnica de evolução molecular *in vitro* (*DNA shuffling*), a análise de sequências nucleotídicas entre os genes *cry1Aa*, *cry1Ia12* e *cry2Aa* foi realizada e os dois primeiros genes foram escolhidos para serem recombinados por essa técnica, pois apresentam maior identidade nucleotídica. Após o *DNA shuffling*, foi obtida uma biblioteca combinatória contendo $1,36 \times 10^6$ genes *cry1Aa* e *cry1Ia12* variantes. Antes de iniciar a seleção das variantes Cry utilizando *Phage display* (*biopanning*), os receptores presentes nas membranas do intestino (BBMVs) das larvas de broca gigante da cana-de-açúcar foram testados quanto a sua

qualidade e apresentaram um enriquecimento de 7,0 a 13,5 vezes em relação às enzimas marcadoras testadas. Foram selecionados cinco genes *cry* variantes mostrando afinidade às BBMV's de *T. l. licus*. Estes foram expressos em *E. coli* e as proteínas validadas por bioensaios e em ensaios de ligação às BBMV's. Foram identificadas duas toxinas CryIIa12 variantes com aumento na atividade entomotóxica de 2,5 a 3,5 vezes, comparado com a toxina selvagem, além da atividade da toxina Cry2Aa demonstrada ser efetiva contra o inseto-praga em questão; atividades entomotóxicas essas sujeitas à proteção sob a forma de patente. Os resultados aqui apresentados serão utilizados para a construção de vetores de expressão em plantas para uso na transformação genética de cana-de-açúcar, visando a resistência à broca gigante da cana-de-açúcar.

Palavras-chave: Toxinas Cry, Broca gigante da cana-de-açúcar, *Telchin licus licus*, DNA shuffling, Phage display.

2. ABSTRACT

In Brazil, the sugarcane crops (*Saccharum officinarum*) have great emphasis, with approximately 40% world production. It presents estimated production about 571 million tonnes for the 2011/2012 harvest, with an interesting and environmentally friendly alternative for the production of renewable energy sources. Although Brazil is ranked among the world's leading producers of sugarcane, regions like the Northeast and Southeast have economic problems related to damage caused by the attack of insect pests, especially the sugarcane giant borer (*Telchin licus licus*) (Lepidoptera: Castniidae) and sugarcane borer (*Diatraea saccharalis*) (Lepidoptera: Crambidae), respectively. The difficulty in controlling these pests is the fact that they have endophytic habit, blocking the chemical insecticides action. In this context, several entomotoxic proteins have been described as potential candidates for the control of insect pests. Cry toxins or δ -endotoxins secreted by Gram-positive bacterium *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) are effectively used to control insect pests because of their specificity and toxicity of some insect orders. In this work, the goal is creating and selecting Cry toxins effective against *T. l. licus*, using the *DNA shuffling* and *Phage display* molecular techniques. Bioassays results using *Bt* strains (*Bt* sor. *kurstaki* S2195 and S1905 and *Bt* sor. *tolworthi* S135 and S62) and 1st instar *T. l. licus* larvae showed high mortality in treatments with *Bt* sor. *kurstaki*. The *cry* genes were present in that serovars were determined and osmotic swelling assays based on light scattering indicated that Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, CryIIa12 and Cry2Aa toxins were able to form pores in *T. l. licus* BBMV. In bioassays with the same Cry toxins (1 mg/mL) and *T. l. licus* larvae, effectiveness was demonstrated, with a mortality rate of approximately 90%. In order to obtain new molecules for *in vitro* molecular evolution application, nucleotide sequences analysis between *cry1Aa*, *cryIIa12* and *cry2Aa* was held and the first two were chosen to be recombined by this technique therefore have higher nucleotide identity. After *DNA shuffling*, a combinatorial library was obtained containing 1.36×10^6 variant *cry1Aa* and *cryIIa12* genes. Before start selecting Cry variants using Phage display (biopanning), the receptors present in sugarcane giant borer midgut membranes (BBMVs) were tested for their quality and exhibited enrichment from 7.0 to 13.5-fold relative to marker enzymes tested. We selected five genes showing affinity to *T. l. licus* BBMV. These were expressed in *E. coli*, validated by bioassays and BBMV binding assays. We

identified two variant Cry1Ia12 toxins exhibiting increased activity of 2.5 to 3.5 times compared to wild toxin; further the Cry2Aa toxin activity showed to be effective against the insect pest in question, activities subject to protection under patent. The results presented here will be used for the expression vectors construction in sugarcane genetic transformation, in order to resistance to sugarcane giant borer.

Keywords: Cry toxins, sugarcane giant borer, *Telchin licus licus*, DNA shuffling, Phage display.

3. INTRODUÇÃO

3.1. Cana-de-açúcar e o agronegócio brasileiro

A cana-de-açúcar (*Saccharum spp* L.) é uma planta de grande relevância para a agricultura mundial pertencente à família Poaceae e à classe monocotiledônea. As principais espécies surgiram na Oceania (Nova Guiné) e na Ásia (Índia e China) enquanto que as variedades cultivadas no Brasil e no mundo são híbridos multiespecíficos. As principais características dessa família são a inflorescência em forma de espiga, o crescimento do caule em colmos, as folhas com lâminas de sílica em suas bordas e a bainha aberta (Diola and Santos 2010). Seu cultivo data de 20 mil anos, quando era utilizada para a extração de um xarope com propriedades medicinais. Por sua grande capacidade de acúmulo de sacarose e facilidade de cultivo, a cana-de-açúcar logo interessou a portugueses e espanhóis e, durante o século XVI, foi introduzida no continente americano (SIAMIG 2011). As espécies do gênero *Saccharum* estão incluídas na tribo Andropogoneae, a qual consiste de espécies de gramíneas que se desenvolveram nos Velho e Novo Mundo. Os mais importantes membros cultivados desta tribo são o milho (*Zea mays*) e o sorgo (*Sorghum bicolor*) (Daniels and Roach 1987), além da própria cana-de-açúcar.

O recente retorno aos aumentos no preço do petróleo, as perspectivas de esgotamento das reservas, os riscos geopolíticos decorrentes da dependência do petróleo de países politicamente instáveis e os compromissos mais sólidos com a questão ambiental fizeram renascer a atenção nas fontes alternativas de energia (Tabela 1) (Bastos 2007).

Tabela 1. Matérias-primas de biocombustíveis (Internacionais 2010)

PRIMEIRA GERAÇÃO (TECNOLOGIAS COMERCIALIZADAS)		SEGUNDA GERAÇÃO (TECNOLOGIAS EMERGENTES)	
Matéria-Prima	Uso	Matéria-prima	Uso
Milho, cana-de-açúcar, melão e sorgo	Etanol	Resíduos agrícolas, como palha de milho, palha de trigo e arroz, esterco e bagaço (resíduos de cana-de-açúcar e talo de sorgo)	Metano, etanol celulósico, usina elétrica
Soja e outros óleos vegetais, gordura reciclada, gordura de origem bovina	Biocombustível	Biomassa de florestas, como resíduos de madeira, madeira	Etanol celulósico e usina elétrica
		Resíduos urbanos de madeira e aterros	Metano, etanol celulósico, eletricidade
		Plantas herbáceas, como gramíneas <i>switchgrass</i> (<i>Panicum virgatum</i>), <i>miscanthus</i> , capim-amarelo (<i>Phalaris arundinacea</i>), sorgo doce, alfafa	Etanol celulósico e usina elétrica

A importância da cultura da cana-de-açúcar vem aumentando ao longo dos anos, uma vez que, além de ser utilizada para a produção de açúcar, alimentação animal, energia e fertilizantes, também se apresenta como uma fonte para a produção de combustíveis renováveis, possuindo rápido crescimento e alta produção de energia por hectare (Hartemink 2008). Para produzir biomassa em atendimento à necessidade energética da humanidade sem competir com a produção de alimentos, deve-se priorizar a produção de plantas fibrosas em vez de amiláceas e oleaginosas (Sticklen 2008). Nesse contexto, plantas fibrosas, como a cultura da cana-de-açúcar, apresentam vantagens, como (i) plantas de alta eficiência energética, (ii) crescimento perene e dossel de longa duração para permitir a colheita durante a maior parte do ano, (iii) possibilidade de aplicação de tecnologia agrícola de produção em grande escala, (iv) serem de fácil e eficiente transformação em formas utilizáveis de energia e (v) de possuírem exploração sustentável econômica e ambientalmente (Matsuoka *et al.* 2010).

O Brasil ocupa posição destacada na produção mundial de etanol a partir da cana-de-açúcar. De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB 2011), a previsão do total de cana-de-açúcar a ser moída na safra 2011/2012 é de 571,5 milhões de toneladas em uma área total de aproximadamente oito milhões de hectares. Destes, 47,3% serão destinados à produção de açúcar enquanto que 52,7% à produção

de etanol, o que permitirá produzir 22,8 bilhões de litros de álcool. Esses valores colocam o Brasil em primeiro lugar entre os maiores produtores de cana-de-açúcar, seguido por Índia, Tailândia e China (USDA 2010). Os principais fatores que permitiram ao país chegar a esse patamar foram à disponibilidade de terras agricultáveis, um custo total de produção reduzido, a larga experiência nacional, a grande demanda por açúcar e o aumento da necessidade de utilização de fontes de energias limpas e renováveis (Goldemberg 2007).

Num contexto mais generalizado, a safra agrícola brasileira de 2011/2012 está na ordem de 160,3 milhões de toneladas. O resultado está 0,3% acima da safra anterior, com variação positiva de 2,7% na área plantada. Esse desempenho coloca o país entre os mais competitivos do mundo, com capacidade de atender ao aumento da demanda por alimentos. O Brasil já é um dos principais fornecedores de proteínas no mercado internacional de alimentos, destinando o excedente de sua produção a 215 destinos do globo. O agronegócio brasileiro registrou até outubro de 2011, US\$ 202 bilhões em exportações, o que já superava o valor contabilizado em todo ano de 2010, que foi recorde na série histórica do país. Dentre os produtos comercializados no agronegócio, o açúcar foi o de maior importância nas exportações, sendo responsável por 18% das exportações e assumindo o segundo lugar no ranking de produtos exportados, ficando atrás apenas da soja (MAPA 2011). Quanto ao etanol, houve uma redução considerável nas exportações, devendo-se principalmente ao fato de os Estados Unidos terem comprado menos, uma vez que diminuíram os custos de produção e transporte de etanol de milho, tornando-os os principais produtores de etanol vegetal em todo o mundo (USDA 2010). Para aumentar a competitividade do etanol brasileiro no mercado internacional, serão necessários maiores investimentos em infraestrutura, construção de dutos para diminuir custos de transporte, formação de estoques reguladores e aumento no rendimento das plantas (BNDES 2008). Os fatores abióticos, como os estresses hídrico e salino, e fatores bióticos, como vírus, fungos, nematóides e insetos-praga, sendo esse último de destacada importância, interferindo no rendimento das plantas.

3.2. Insetos-praga de impacto econômico na cultura canavieira

Aproximadamente 85 espécies de insetos estão identificadas como causadoras de danos a lavoura canavieira no Brasil, diminuindo a sua produtividade e/ou a qualidade do produto. Dentre estas, algumas são consideradas pragas importantes, em alguns casos com abrangência nacional e em outros, regional (Macedo *et al.* 2010).

Entre os diversos insetos-praga que atacam a cana-de-açúcar, estão incluídos os cupins, *Heterotermes tenuis* (Hagen, 1858), *Procornitermes* spp., *Neocapritermes* spp., *Nasutitermes* spp., *Syntermes molestus* (Burmeister, 1839), *Amitermes* spp., *Rynchotermes* spp., *Cornitermes* spp. (Isoptera: Termitidae), a cigarrinha-da-folha, *Mahanarva posticata* (Stal, 1855), a cigarrinha-da-raiz, *M. fimbriolata* (Stal, 1854) (Homoptera: Cercopidae), o Migdolus, *Migdolus fryanus* (Westwood, 1863) (Coleoptera: Cerambycidae), a lagarta elasmó, *Elasmo lignosellus* (Zeller, 1848) (Lepidoptera: Pyralidae), a broca peluda, *Hyponeuma taltula* (Schaus, 1904) (Lepidoptera: Noctuidae), os bicudos da cana-de-açúcar, *Metamasius hemipterus* (L., 1765) e *Sphenophorus levis* (Varrie, 1978) (Coleoptera: Curculionidae), as saúvas, *Atta bisphaerica* (Forel, 1908), *A. capiguara* (Gonçalves, 1944), *A. laevigata* (F. Smith, 1858). Além disso, a cultura da cana-de-açúcar é alvo de ataque por considerável número de fitonematóides, com maior destaque para os dos gêneros *Meloidogyne* e *Pratylenchus*, com importância para o Brasil, as espécies *Meloidogyne incognita* (Kofoid e White) Chitwood, *M. javanica* (Treub) Chitwood e *Pratylenchus zeae* Graham (Cadet e Spaul, 2005) (Macedo *et al.* 2010).

No cenário brasileiro, os insetos-praga causadores de maiores danos são: a broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis* (Fabr. 1794; Lepidoptera: Crambidae), um inseto lepidóptero, que após completo desenvolvimento larval atinge 30 mm e a broca gigante da cana-de-açúcar, *Telchin licus licus* (Drury 1773; Lepidoptera: Castniidae), outro inseto lepidóptero que, no final da fase larval, atinge até 90 mm (Figura 1), apresentando controle bastante difícil devido a inacessibilidade às lagartas que ficam no interior do colmo.

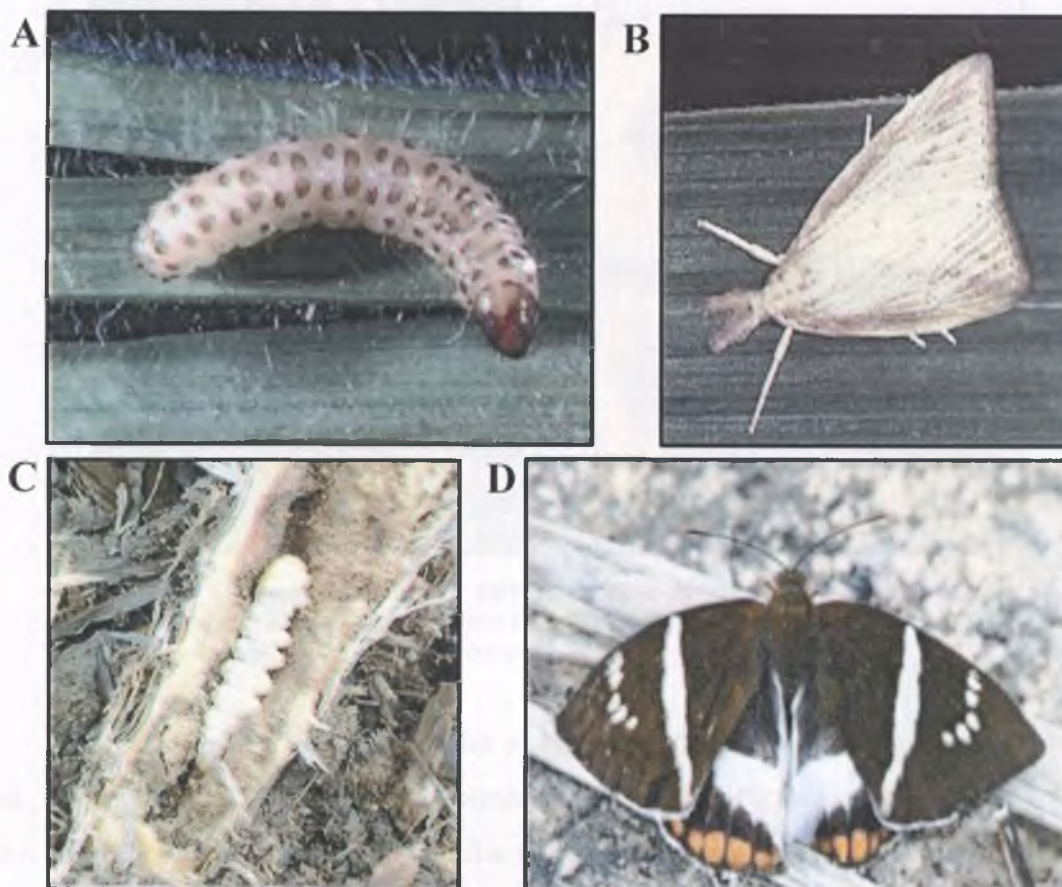


Figura 1. Principais insetos-pragas que atacam a cana-de-açúcar no Brasil. Broca da cana-de-açúcar, *D. saccharalis*: (A) Lagarta (www.viarural.com.ar) e (B) Espécime adulto (USDA); Broca gigante da cana-de-açúcar, *T. l. licus*: (C) Lagarta (Avelar Brandão) e (D) Espécime adulto (Heraldo Negri).

As lagartas, quando atacam as plantas de canas-de-açúcar novas, causam os conhecidos “corações-mortos” (Figura 2A). Em plantas adultas, ocorre perda de peso, brotação lateral, quebra e atrofiamento de entrenós. A penetração de fungos (*Fusarium moniliforme* e/ou *Colletotrichum falcatum*) nas galerias abertas pelas brocas, muito comum após o ataque das lagartas, ocasiona, por sua vez, a podridão vermelha (Figura 2B), que determina a inversão da sacarose, diminuição da pureza do caldo, aumento de gomas e contaminantes, reduzindo o rendimento industrial da cana-de-açúcar (Planalsucar 1977).

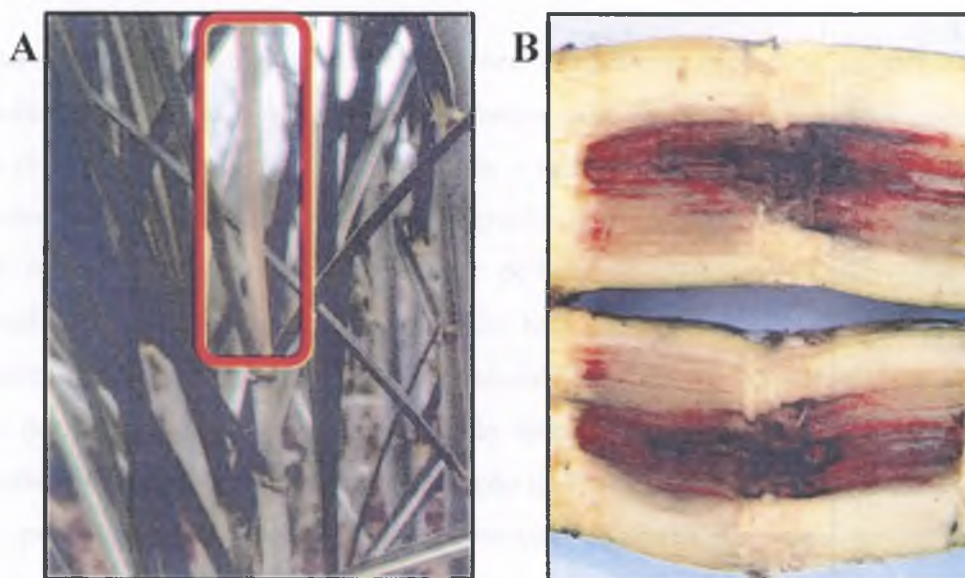


Figura 2. Sintomas de ataques à cultura da cana-de-açúcar. A. “Coração-morto”: sintoma de ataque de *D. saccharalis* e B. Podridão vermelha: infecção pelos fungos *F. moniliforme* e/ou *C. falcatum* (Borém *et al.* 2010).

A *D. saccharalis* ocorre em todas as regiões onde se cultiva cana-de-açúcar no Brasil, enquanto que *T. l. licus* predomina na região Nordeste, especialmente nos estados de Alagoas, Pernambuco, Paraíba e Rio Grande do Norte (Mendonça *et al.* 1996). Também foi encontrada no estado de São Paulo, causando grande preocupação por tratar-se de uma praga que causa, anualmente, prejuízos na ordem de 35 milhões na região Nordeste e, projeta-se, até 400 milhões de reais, por safra, na região Sudeste (Almeida *et al.* 2007). Estes dados são alarmantes e requerem medidas para evitar uma perda de competitividade do setor sucroalcooleiro nacional. E uma medida preventiva, seria tornar a cana-de-açúcar resistente a insetos-praga, através de transformação genética com genes de interesse ou por melhoramento genético clássico.

3.3. Melhoramento genético da cana-de-açúcar

Os programas de melhoramento utilizados rotineiramente para a cana-de-açúcar são baseados em cruzamentos interespecíficos. No início dos trabalhos de melhoramento genético da cultura, foram realizados cruzamentos entre *S. officinarum*, uma espécie domesticada produtora de açúcar, que contém $2n = 80$ cromossomos e *S. spontaneum*, uma espécie selvagem contendo $2n = 40-128$. O híbrido obtido foi submetido à retrocruzamentos com *S. officinarum*, resultando em plantas com maior teor de açúcar, característica principal da *S. officinarum* combinado com a resistência a doenças e estresses características de *S. spontaneum* (Matsuoka *et al.* 2009). Apesar do

sucesso na obtenção de plantas melhoradas, nem sempre essa é a melhor estratégia a ser utilizada, uma vez que o número cromossômico entre as espécies silvestres pode ser muito diferente, o que gera híbridos estéreis e retarda em até 15 anos o processo de obtenção de plantas com características agrônômicas desejáveis (Lakshmanan *et al.* 2005). Além disso, o mercado consumidor de cana-de-açúcar e seus derivados vêm crescendo aceleradamente em todo o mundo, bem como a preocupação com o meio ambiente. Tudo isso exige que o setor sucroalcooleiro produza cada vez mais em menos tempo para atingir a crescente demanda do mercado. Dessa forma, a utilização de ferramentas biotecnológicas e a transformação de plantas vêm ganhando mais espaço como estratégias promissoras para a obtenção de cultivares mais produtivas e resistentes, além de serem menos prejudiciais ao meio ambiente e reduzirem os custos de produção (Nóbrega and Dornelas 2006).

A modificação genética da cana-de-açúcar pode ser uma ferramenta poderosa por introduzir características como resistência a patógenos e a doenças em variedades comerciais de cana-de-açúcar, aumentar seu desempenho agrônômico e obtenção de açúcar. Além disso, a modificação genética pode ser usada para aumentar a biomassa da cana-de-açúcar e reduzir o custo de produção do etanol celulósico de segunda geração, por expressar nestas plantas enzimas necessárias para converter celulose em açúcares fermentáveis (Borém *et al.* 2010).

Os primeiros experimentos de transformação de cana-de-açúcar objetivaram a inserção de genes que conferiam resistência a antibiótico e tolerância a herbicida (Bower and Birch 1992; Arencibia *et al.* 1997). Num segundo momento, para se obter uma variedade cana-de-açúcar resistente a insetos, foram utilizados genes *cry*: *cry1Ac*, *cry1F*, *cry3A*, *cry3Bb1* e *vip3A* provenientes da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Lu *et al.* 1994; Arencibia *et al.* 1997; Ingelbrecht *et al.* 1999; Dal-Bianco *et al.* 2011).

O sequenciamento do genoma da cana-de-açúcar apresenta-se como um desafio devido a sua estrutura altamente poliplóide e aneuplóide com um conjunto de genes preditos numa faixa de 10 a 12 cópias (alelos). O genoma monoplóide é estimado em cerca de 1 Gb, mas o alto nível de polimorfismos requer novos algoritmos de montagem que podem levar em conta a variação alélica e um alto teor de regiões repetitivas. Obter-se um genoma monoplóide de referência para esta cultura é um dos grandes desafios na atual genômica (Macedo *et al.* 2010). Dentre as ferramentas biotecnológicas que vêm sendo desenvolvidas, o SUCEST (Sugarcane Expressed Sequence Tags) sequenciou mais de 290 mil sequências de diferentes partes da planta

como raiz, caule e folhas, em diferentes estágios de desenvolvimento, sob diferentes condições ambientais e/ou na presença de patógenos. Dessa maneira, diversos genes envolvidos com a resposta a estresse hídrico, resistência a insetos, metabolismo e desenvolvimento da planta foram identificados (Souza and Silva 2002). Este banco de dados está sendo complementado para incluir dados proteômicos e metabolômicos, bem como marcadores moleculares, sequências genômicas e promotores (Paterson *et al.* 2010).

O uso de diferentes técnicas de introdução dos genes de interesse no genoma da planta surge como uma forma de evitar os problemas provenientes da complexidade genética das variedades de cana-de-açúcar, decorrente do elevado nível de ploidia e ocorrência de aneuploidia, que constituem os principais obstáculos para a geração de variedades geneticamente melhoradas por métodos convencionais (Lakshmanan *et al.* 2005). Dessa forma, diversas técnicas foram desenvolvidas e testadas em cana-de-açúcar, destacando-se a transformação genética mediada por aceleração de micropartículas (biobalística), onde vários tecidos já foram testados com sucesso, mesmo exigindo tempo para regeneração e apresentando uma eficiência de transformação de 0,1% que pode variar de acordo com a variedade em estudo. Além disso, outra metodologia que tem sido utilizada com sucesso envolve *Agrobacterium tumefaciens*, apresentando vantagens como: número baixo de cópias do transgene, levando a poucos problemas com eventos de co-supressão e instabilidade dos genes (Enríquez *et al.* 2000; Lakshmanan *et al.* 2005; Borém *et al.* 2010). Dentre os diferentes genes que podem ser utilizados para transformar cana-de-açúcar, como genes para inibidores de proteinases (Prasad *et al.* 2010), para toxinas VIP (Hernández-Rodríguez *et al.* 2009), podendo ser destacados os genes *cry* (Bravo *et al.* 2011).

3.4. Toxinas Cry

3.4.1. Aspectos gerais

O *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), é uma bactéria de solo, aeróbia, Gram positiva, que se caracteriza pela produção de inclusões protéicas cristalinas no momento da sua esporulação (Figura 3). Estes cristais podem conter uma ou mais proteínas inseticidas, denominadas δ -endotoxinas ou proteínas Cry, as quais apresentam peso molecular entre 40 e 140 kDa. Essas proteínas pertencem a um grupo de proteínas conhecidas como toxinas formadoras de poros e seus efeitos tóxicos são devidos à

formação de poros iônicos na membrana das células epiteliais do intestino de insetos (Bravo *et al.* 2005). As propriedades inseticidas de *Bt* foram reconhecidas muitos anos antes da bactéria ser identificada, com alguns relatos sugerindo que os esporos de *Bt* teriam sido usados no Antigo Egito. Na Era Moderna, a bactéria foi isolada em 1901 pelo biólogo japonês Shigetane Ishiwatari durante uma investigação de uma doença de bichos-da-seda, e o nomeou de *Bacillus sotto*. Dez anos depois, a mesma bactéria foi isolada por Ernst Berliner de um inseto lepidóptero *Ephestia kuehniella* doente na província alemã de Thuringia, e foi denominada *Bacillus thuringiensis* (Ahmad *et al.* 2005).

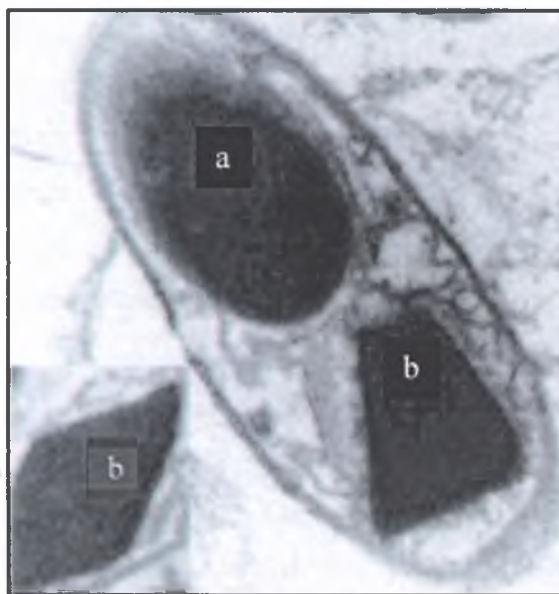


Figura 3. *Bacillus thuringiensis*. Durante sua fase de multiplicação as bactérias sintetizam proteínas que se acumulam na periferia dos esporos (a) na forma de cristais (b) (Bobrowski *et al.* 2003).

As propriedades inseticidas dos cristais foram descobertas quando lagartas de *E. kuehniella* mortas foram encontradas com esporos e cristais. O contato direto entre os esporos/cristais e lagartas saudáveis não tinham efeito, mas quando os esporos e os cristais cobriram folhas e foram ingeridos pelas lagartas, as mesmas pararam de se alimentar e morreram. Após reconhecer o potencial de *Bt* como inseticidas, Heckmann e colaboradores (2006) isolaram a cepa de *Bt* descoberta por Ernst e os testes de campo realizados com a broca europeia do milho (*Ostrinia nubilalis*) deram resultados com o desenvolvimento do inseticida à base de *Bt*, *Sporeine* (Husz 1930).

Essas toxinas são, portanto descritas como potenciais candidatas no controle de insetos-praga (Carlini and Grossi-de-Sa 2002; Christou *et al.* 2006). Suas propriedades inseticidas afetam diversas ordens de insetos, além de outros tipos de invertebrados, como nematóides e ácaros (Marroquin *et al.* 2000). São amplamente descritas na literatura (Höfte and Whiteley 1989; Feitelson *et al.* 1992; Schnepf *et al.* 1998; Bravo *et al.* 2005; Bravo and Soberón 2008) e especialmente interessantes devido à sua especificidade e por serem inócuas a vertebrados e insetos não alvos. O efeito de culturas *Bt* em macroorganismos tem sido estudado em experimentos de laboratório e de campo, indicando que as toxinas Cry não são tóxicas a esses organismos (Ahmad *et al.* 2005; Heckmann *et al.* 2006; Vercesi *et al.* 2006; Liu *et al.* 2009; Bai *et al.* 2010). O *Bt*, ao longo do tempo, tem sido utilizado como um inseticida microbiano, sendo considerada uma alternativa para substituir a aplicação de inseticidas químicos sintéticos na agricultura comercial, no manejo florestal e no controle de mosquitos vetores de uma variedade de doenças humanas e animais. Além disso, é fonte para isolar genes para aplicação na geração de plantas transgênicas resistentes a insetos-praga (Höfte and Whiteley 1989; Patten *et al.* 1997).

3.4.2. Modo de ação

As estruturas tridimensionais de algumas toxinas Cry (Cry1Aa, Cry1Ac, Cry2Aa, Cry3A, Cry3Bb1, Cry4Aa, Cry4Ba, Cry8Ea1) já foram resolvidas (Li *et al.* 1991; Grochulski *et al.* 1995; Derbyshire *et al.* 2001; Galitsky *et al.* 2001; Morse *et al.* 2001; Boonserm *et al.* 2005; Boonserm *et al.* 2006; Guo *et al.* 2009), indicando que são formadas por três domínios (Figura 4). O domínio I consiste de um feixe de sete α -hélices antiparalelas, com a hélice central (α 5) hidrofóbica, rodeada por hélices anfipáticas (Li *et al.* 1991), sendo muito semelhante ao domínio formador de poros da colicina A (Parker *et al.* 1989). O domínio II é constituído por três folhas β -antiparalelas e duas α -hélices curtas, que conferem a especificidade de ligação aos receptores (Dean *et al.* 1996). O domínio III consiste de duas folhas β -antiparalelas, altamente enoveladas, contendo a região C-terminal da maioria das proteínas, estando fortemente envolvido na estabilidade estrutural da molécula inteira, além da especificidade ou formação do poro em conjunto com o domínio I (Rukmini *et al.* 2000). Após o alinhamento das toxinas Cry, foi mostrada a presença de cinco blocos de sequências comuns a grande maioria dessas proteínas; e a presença ou ausência desses blocos caracterizam os subgrupos da família das toxinas Cry. O bloco conservado 1 está na

hélice central do domínio I, o bloco 2 está na interface dos domínios II-III, o bloco 3 está na ligação entre os domínios II e III, o bloco 4 está na folha β central do domínio III e o bloco 5 está no final do domínio III (de Maagd *et al.* 2001).

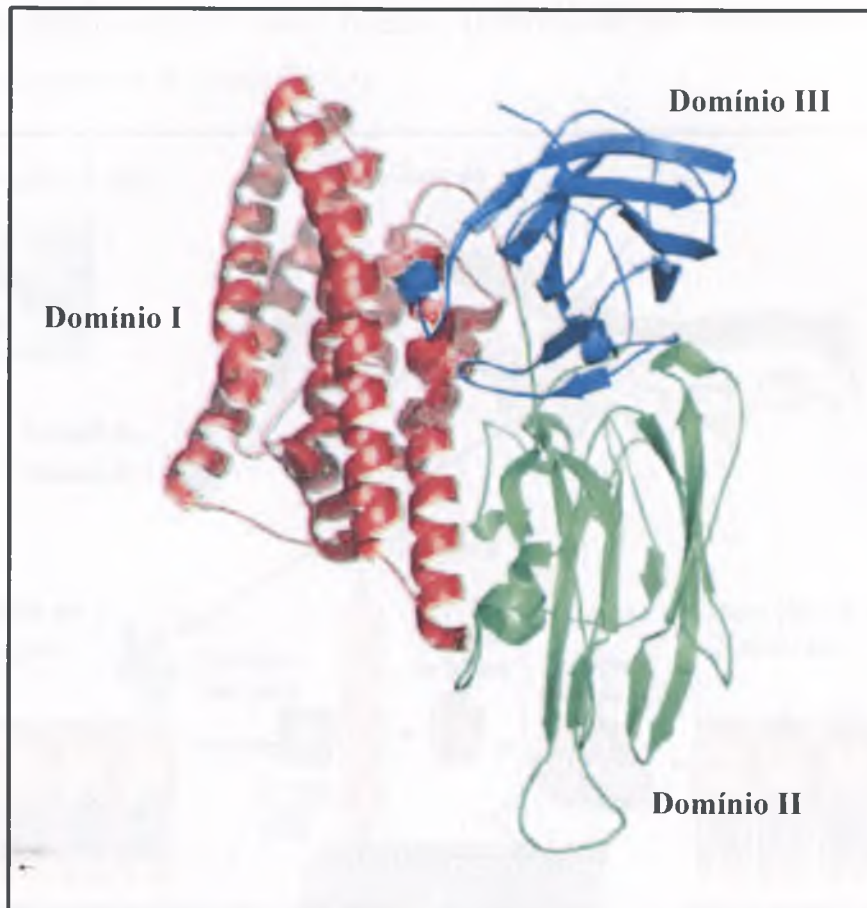


Figura 4. Estrutura tridimensional da toxina Cry1Aa, mostrando seus domínios. Adaptado de Pigott and Ellar, 2007.

O modelo de ação das toxinas Cry é controverso. De acordo com o modelo de formação de poros, baseado em interações da Cry1Ab com BBMV do inseto lepidóptero *Manduca sexta* (Bravo *et al.* 2004), a ligação da toxina Cry ativa a proteína receptora caderina resulta numa alteração estrutural que favorece a proteólise da toxina, resultando na formação de oligômeros, os quais têm a afinidade de ligação aumentada para *N*-aminopeptidases e provavelmente outras proteínas ancoradas a GPI que se localizam em regiões específicas da membrana chamadas *lipid rafts* (Zhuang *et al.* 2002). De acordo com este modelo, uma concentração de oligômeros de toxina localizada nos *lipid rafts* leva a inserção na membrana, seguido pela formação de um poro que resulta em choque osmótico às células do intestino médio e, finalmente, na morte do inseto. Outro modelo para a morte das células do intestino médio envolve a

transdução de sinais, no qual a Cry1Ab monomérica liga-se ao receptor BT-R₁ e inicia uma cascata de sinalização dependente de Mg²⁺, que ativa uma via intracelular que leva a apoptose (Zhang *et al.* 2005). Um terceiro modelo foi proposto, no qual elementos dos modelos de formação de poros e de transdução de sinal são combinados (Jurat-Fuentes and Adang 2006), utilizando como modelo o inseto lepidóptero *Heliothis virescens* para investigar receptores da toxina Cry1Ac.

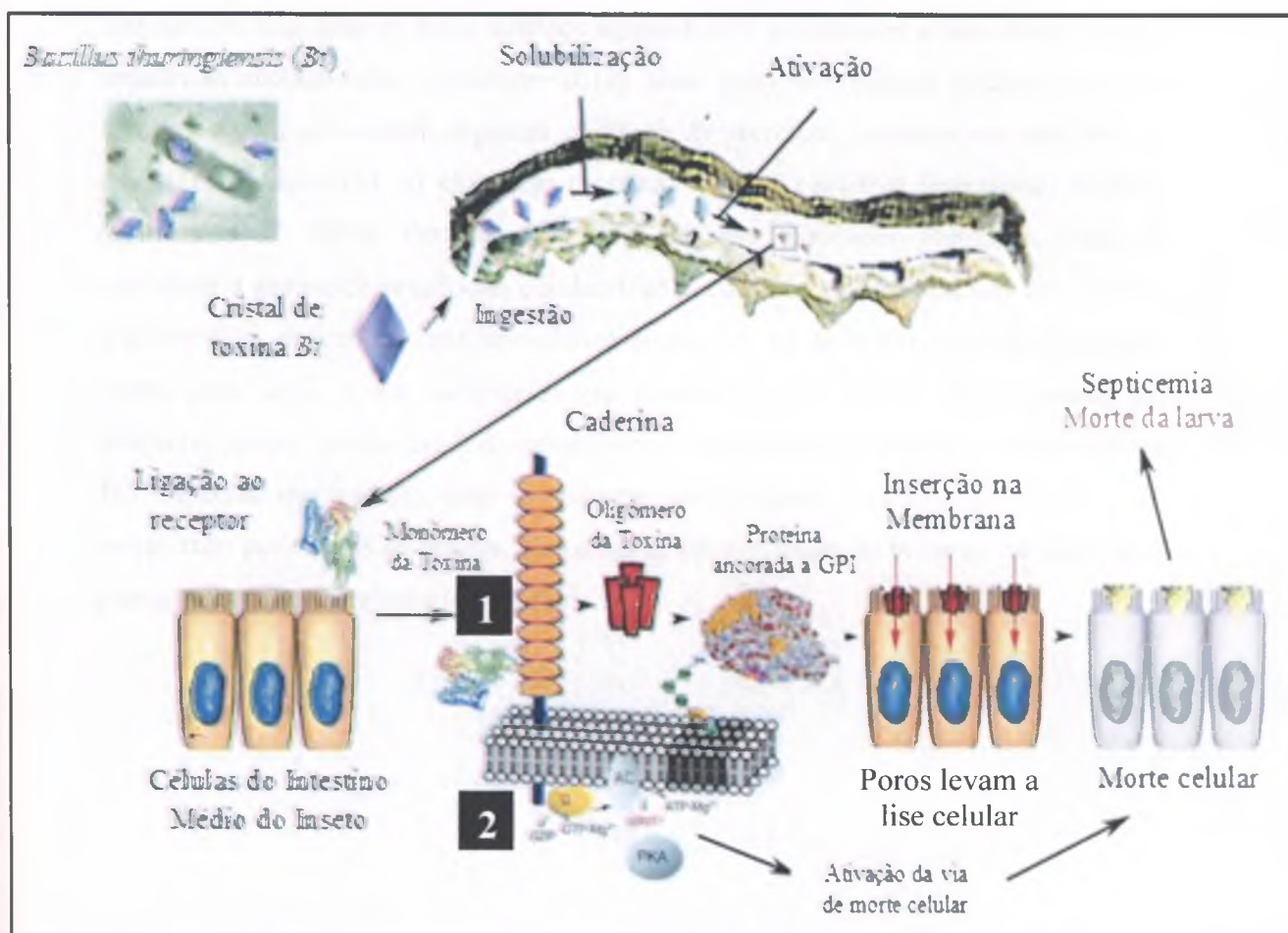


Figura 5. Esquema ilustrando os modelos para a ação das toxinas Cry. (1) Modelo de formação de poros proposto por Bravo *et al.* 2004, (2) Modelo de transdução de sinais proposto por Zhang *et al.* 2005, (3) Modelo híbrido, envolvendo elementos dos modelos (1) e (2) proposto por Jurat-Fuentes and Adang, 2006. Figura adaptada de <http://web.utk.edu/~jurat/Btresearchtable.html>.

3.5. Biotecnologia e toxinas Cry

3.5.1. Plantas geneticamente modificadas (GM) expressando toxinas Cry

As primeiras plantas geneticamente modificadas (GM) resistentes a insetos foram produzidas em 1987, quando genes *cry* foram expressos em tabaco (Arencibia *et al.* 1997). Desde então, o número de países que passaram a utilizar as

culturas GM têm aumentado de forma constante. Em 2011, 16,7 milhões de agricultores em 29 países cultivaram lavouras GM, com uma área global plantada de 160 milhões de hectares. O Brasil produz soja, milho e algodão GM resistentes a insetos (utilizando genes *cry*) e a herbicidas, numa área de 30,3 milhões de hectares, posicionando-se em 2011 como o segundo maior produtor mundial (James 2011).

Atualmente, encontram-se descritas na literatura 70 famílias de toxinas Cry, com seus diversos subtipos agrupados de acordo com a homologia de suas sequências nucleotídicas (Crickmore 2012). Nem todas as proteínas produzidas por *Bt* agregam-se em um cristal; algumas cepas de *Bt* secretam proteínas em sua fase de crescimento vegetativa, as chamadas proteínas VIPs (Vegetative Insecticidal Protein) (Estruch *et al.* 1996). Para se determinar as suas atividades pesticidas, além de considerar a análise de sequências e a classificação das diversas toxinas Cry em famílias e subfamílias, devem ser realizados bioensaios a fim de definir o nível de toxicidade contra cada alvo, como compilados em Frankenhuyzen (2009). Nessa revisão de literatura, o autor reuniu dados de centenas de bioensaios feitos com 125 toxinas *versus* 163 espécies de insetos, onde o espectro de atividade das toxinas testadas foi sumarizado por ordens de insetos. Na tabela 2, são mostradas as culturas transformadas com genes *cry* para resistência a insetos.

Tabela 2. Culturas transformadas com genes *cry* visando à resistência a insetos-praga (James 2010)

Cultura	Genes	Ordem de insetos-alvo	Principais espécies-alvo
Algodão	<i>cry1Ac</i>	Lepidoptera	<i>Heliothis virescens</i> , <i>Pectinophora gossypiella</i> , <i>Helicoverpa zea</i> , <i>Helicoverpa armigera</i>
	<i>cry1Ab/c</i>		<i>H. virescens</i> , <i>P. gossypiella</i> , <i>H. zea</i> , <i>H. armigera</i>
	<i>cry1Ac+cpTI</i>		<i>P. gossypiella</i> , <i>H. armigera</i>
	<i>cry1Ac+cry2Ab</i>		<i>H. virescens</i> , <i>P. gossypiella</i> , <i>H. zea</i> , <i>H. armigera</i>
	<i>cry1A+cry1F</i>		<i>Spodoptera</i> spp.
	<i>cry1F</i>		<i>H. virescens</i> , <i>H. zea</i> , <i>Spodoptera exigua</i> , <i>Pseudoplusia includens</i>
Algodão	<i>vip3A</i>		<i>H. virescens</i> , <i>H. zea</i> , <i>P. gossypiella</i> , <i>S. exigua</i> , <i>P. includens</i> , <i>Trichoplusia ni</i> , <i>Spodoptera frugiperda</i> , <i>Bucculatrix thurberiella</i>
	<i>vip3A+cry1Ab</i>		<i>H. virescens</i> , <i>P. gossypiella</i> , <i>H. zea</i> , <i>H. armigera</i>
Milho	<i>cry1Ab</i>		<i>Ostrinia nubilalis</i>
	<i>cry1Ab+mcry3A</i>	Lepidoptera, Coleoptera	<i>O. nubilalis</i> , <i>Diabrotica</i> spp.
	<i>cry1F</i>	Lepidoptera	<i>O. nubilalis</i> , <i>S. frugiperda</i> , <i>Diatraea grandiosella</i> , <i>Striacosta albicosta</i> , <i>Agrotis ipsilon</i> , <i>H. zea</i>
	<i>cry34Ab1+cry35Ab1</i>	Coleoptera	<i>Diabrotica</i> spp.
	<i>cry34Ab1+cry35Ab1+cry1Fa2</i>	Lepidoptera, Coleoptera	<i>O. nubilalis</i> , <i>Diabrotica</i> spp.

	<i>mcry3A</i>	Coleoptera	<i>Diabrotica vigifera vigifera</i> , <i>Diabrotica berberi</i> , <i>Diabrotica</i> <i>vigifera zae</i>
	<i>cry3Bb1</i>		<i>Diabrotica</i> spp.
	<i>cry1A.105+cry2Ab2</i>	Lepidoptera	<i>Ostrinia</i> spp., <i>S. frugiperda</i>
	<i>cry1A.105+cry2Ab+cry3Bb1+cry34Ab1+cry35Ab1+cry1Fa2</i>	Lepidoptera, Coleoptera	<i>H. zea</i> , <i>O. nubilalis</i> , <i>S. frugiperda</i> , <i>D. grandiosella</i> , <i>Diatraea</i> <i>saccharalis</i> , <i>S. albicosta</i> , <i>A. ipsilon</i> , <i>D. v. vigifera</i> , <i>D. berberi</i> , <i>D. v. zae</i>
	<i>vip3Aa20+mcry3A+cry1Ab</i>	Lepidoptera, Coleoptera	<i>H. zea</i> , <i>O. nubilalis</i> , <i>S. frugiperda</i> , <i>D. grandiosella</i> , <i>Diatraea</i> <i>saccharalis</i> , <i>S. albicosta</i> , <i>A. ipsilon</i> , <i>Pseudaletia unipunctata</i> , <i>D.</i> <i>crambidoides</i> , <i>Papaipema nebris</i> , <i>D. v. vigifera</i> , <i>D. berberi</i> , <i>D. v. zae</i>
Batata	<i>cry3A</i>	Coleoptera	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>
Tomate	<i>cry1Ac</i>	Lepidoptera	<i>H. virescens</i> , <i>P. gossypiella</i> , <i>H.</i> <i>armigera</i> , <i>H. zea</i>
Arroz	<i>cry1Ab</i>		<i>H. virescens</i> , <i>P. gossypiella</i> , <i>H. zea</i> , <i>H. armigera</i>
	<i>cry1Ab/c</i>		<i>Scirpophaga incertulas</i> , <i>Chilo</i> <i>suppressalis</i>
Berinjela	<i>cry1Ac</i>		<i>Leucinodes orbonalis</i>
Crucíferas	<i>cry1</i>		<i>Plutella xylostella</i>

Desde 1986, os primeiros testes de campo foram desenvolvidos com culturas *Bt*. Plantas de tabaco GM expressando um gene que codificava a porção N-terminal da Cry1Aa proveniente de *Bt* sorov. *kurstaki* HD-73 foram obtidas, com o objetivo de testá-las contra o ataque do inseto lepidóptero *Helicoverpa zea* (Hoffmann *et al.* 1992). Plantas contendo dois ou mais genes diferentes, constitui uma técnica denominada piramidização, que tem o potencial de retardar significativamente a evolução da resistência dos insetos comparada com as culturas com um único gene (Zhao *et al.* 2003; Zhao *et al.* 2005), além de aumentar a atividade das toxinas Cry. Por exemplo, nos Estados Unidos e no Canadá, milho GM com três genes foi cultivado, um para controlar o inseto lepidóptero *O. nubilalis*, um para controlar o inseto coleóptero *D. virgifera* e um terceiro gene para tolerância a herbicida (James 2011), outros exemplos de piramidização são a criação da toxina híbrida Cry1Ab/Cry3A, que foi tóxica a *D. virgifera* (Walters *et al.* 2010) e a fusão da toxina Cry1Ba truncada e o domínio II da Cry1Ia, onde plantas de batata expressando esta toxina recombinante apresentaram resistência ao coleóptero *Phthorimaea operculella* e ao lepidóptero *O. nubilalis* (Naimov *et al.* 2003).

As vantagens de usar culturas *Bt* são a redução do uso de inseticidas químicos na lavoura, o controle efetivo de insetos-praga, o aumento do rendimento das lavouras, além de permitir o controle de insetos-praga secundários por organismos benéficos e redução dos níveis de toxinas fúngicas (Betz *et al.* 2000).

3.5.2. Culturas *Bt* liberadas comercialmente no Brasil

As culturas contendo genes *Bt* que foram liberadas comercialmente no Brasil estão sumarizadas nas tabelas 3-5:

Tabela 3. Cultura de soja contendo gene *Bt*, que foi liberada comercialmente no Brasil (CTNBio 2011).

SOJA			
Variedade	Genes inseridos	Proteínas expressas	Resistência
MON 87701 x MON 89788	<i>cp4 epsps</i> e <i>cry1Ac</i>	CP4 EPSPS e Cry1Ac	Herbicida glifosato de amônio e insetos lepidópteros <i>Anticarsia gemmatalis</i> e <i>Pseudoplusia includens</i>

Tabela 4. Culturas de algodão contendo genes *Bt*, que foram liberadas comercialmente no Brasil (CTNBio 2011).

ALGODÃO			
Variedade	Genes inseridos	Proteínas expressas	Resistência
BOLLGARD I	<i>cry1Ac</i>	Cry1Ac	Insetos lepidópteros <i>Alabama argillacea</i> , <i>Pectinophora gossypiella</i> e <i>Heliothis virescens</i>
WIDESTRIKE	<i>cry1Ac</i> , <i>cry1F</i> e <i>bar</i>	Cry1Ac, Cry1F e PAT	Insetos lepidópteros e herbicida glifosato de amônio
BOLLGARD II	<i>cry1Ac</i> e <i>cry2Ab2</i>	Cry1Ac e Cry2Ab2	Insetos lepidópteros <i>A. argillacea</i> , <i>P. gossypiella</i> e <i>H. virescens</i>
MON 531 X MON 1445	<i>cry1Ac</i> e <i>cp4 epsps</i>	Cry1Ac e CP4 EPSPS	Insetos lepidópteros <i>A. argillacea</i> , <i>P. gossypiella</i> , <i>H. virescens</i> e <i>Helicoverpa zea</i> e herbicida glifosato de amônio
TWINLINK	<i>cry1Ab</i> , <i>cry2A</i> e <i>bar</i>	Cry1Ab, Cry2A e PAT	Insetos lepidópteros e herbicida glifosato de amônio

Tabela 5. Culturas de milho contendo genes *Bt*, que foram liberadas comercialmente no Brasil (CTNBio 2011).

MILHO			
Variedade	Genes inseridos	Proteínas expressas	Resistência
GUARDIAN	<i>cry1Ab</i>	Cry1Ab	Insetos lepidópteros <i>Spodoptera frugiperda</i> , <i>Helicoverpa zea</i> e <i>Diatraea saccharalis</i>
Bt11	<i>cry1A</i> e <i>bar</i>	Cry1A e PAT	Insetos lepidópteros e herbicida glifosato de amônio
TC1507	<i>cry1F</i> e <i>bar</i>	Cry1F e PAT	Insetos lepidópteros e herbicida glifosato de amônio
Bt11 X GA21	<i>cry1Ab</i> e <i>bar</i>	Cry1Ab e PAT	Insetos lepidópteros e herbicida glifosato de amônio
MON 810 X NK603	<i>cry1Ab</i> e <i>cp4 epsps</i>	Cry1Ab e CP4 EPSPS	Insetos lepidópteros <i>S. frugiperda</i> , <i>H. zea</i> e <i>D. saccharalis</i> e herbicida glifosato de amônio
MIR 162	<i>vip3Aa20</i>	Vip3Aa20	Insetos lepidópteros <i>H. zea</i> , <i>S. frugiperda</i> , <i>Agrotis ipsilon</i> , <i>Ostrinia nubilalis</i> e <i>Striacosta albicosta</i>
MON 89034	<i>cry1A.105</i> e <i>cry2Ab2</i>	Cry1A.105 e Cry2Ab2	Insetos lepidópteros
TC1507 X NK 603	<i>cry1F</i> e <i>cp4 epsps</i>	Cry1F e CP4 EPSPS	Insetos lepidópteros <i>S. frugiperda</i> , <i>D. saccharalis</i> e <i>H. zea</i> e herbicida glifosato de amônio
Bt11 X MIR162 X GA21	<i>cry1Ab</i> , <i>bar</i> , <i>vip3A20</i> e <i>mpsps</i>	Cry1Ab, PAT, Vip3A20 e mEPSPS	Insetos lepidópteros e herbicida glifosato de amônio
MON 89034 X NK 603	<i>cry1A.105</i> , <i>cry2Ab2</i> e <i>cp4 epsps</i>	Cry1A.105, Cry2Ab2 e CP4 EPSPS	Insetos lepidópteros e herbicida glifosato de amônio
MON88017	<i>cry3Bb1</i> e <i>cp4 epsps</i>	Cry3Bb1 e CP4 EPSPS	Insetos coleópteros do gênero <i>Diabrotica</i> e herbicida glifosato de amônio
MON89034 X TC1507 X NK603	<i>cry1A.105</i> , <i>cry2Ab2</i> , <i>cry1F</i> , <i>bar</i> e <i>cp4 epsps</i>	Cry1A.105, Cry2Ab2, Cry1F, PAT e CP4 EPSPS	Insetos lepidópteros e herbicida glifosato de amônio

As culturas GM contendo genes *Bt* estão ganhando cada vez mais espaço no Brasil (Figura 6), implicando na redução do impacto dos inseticidas químicos no ambiente e nos trabalhadores rurais.

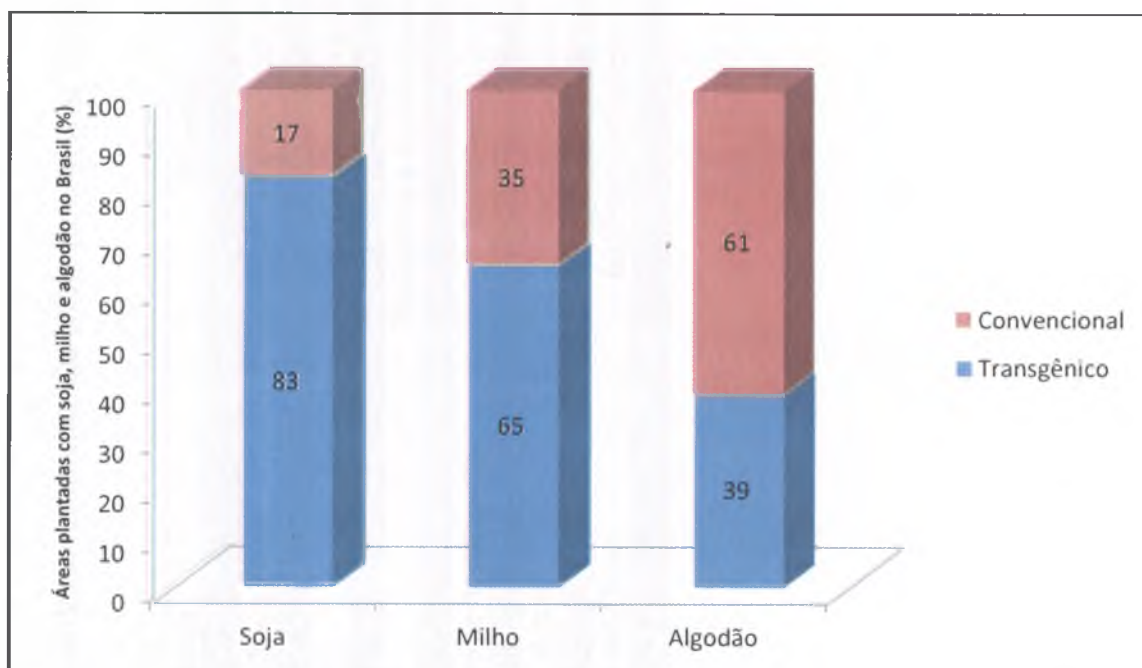


Figura 6. Padrão da adoção da biotecnologia no Brasil (CTNBio 2012).

3.5.3. Cana-de-açúcar – Status das culturas *Bt* no Brasil

Desde 1999, variedades de cana-de-açúcar GM contendo genes *Bt* estão em fase de testes no Brasil (Tabela 6). A Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) já deferiu a liberação planejada no meio ambiente de diversos eventos de cana-de-açúcar GM, ou seja, numa área restrita, são plantados espécimes transformados e são observados seus desempenhos agrônômicos, além da interferência na ecologia de espécies não-alvo (CTNBio, 2011).

Esses espécimes contêm tanto genes que conferem resistência a herbicidas e estresse abiótico, quanto genes que conferem resistência a insetos-praga, principalmente a broca da cana-de-açúcar (*D. saccharalis*). Após a realização e análise de todos os testes de biossegurança, o próximo passo será a liberação comercial.

Tabela 6. Diferentes genes em estudo em cana-de-açúcar geneticamente modificada (GM) (Borém *et al.* 2010)

Gene	Proteína expressa	Fenótipo
<i>cp4 epsps</i>	5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase	Tolerância ao glifosato
<i>pat</i>	Fosfinotricina N-acetiltransferase	Tolerância ao glufosinato de amônio
<i>bxn</i>	Nitrilase	Tolerância ao bromoxinil
<i>cry1Ab</i>	Cry1Ab	Resistência a insetos lepidópteros
<i>cry1Ac</i>	Cry1Ac	Resistência a insetos lepidópteros
<i>vip3A</i>	Vip3A	Resistência a insetos lepidópteros
<i>neo</i>	Neomicina fosfotransferase	Resistência a antibiótico
<i>DREB2</i>	Elemento ligante responsivo de desidratação	Resistência à seca
<i>P5CS</i>	1-pirrolina-5-carboxilato sintetase	Resistência à seca
<i>TPS</i>	Trealose fosfato sintase	Resistência à seca
<i>Si</i>	Sacarose isomerase	Elevado teor de sacarose
<i>SCLFY</i>	Floriculata LEAFY-MADbox	Inibição ao florescimento
<i>GM-CSF</i>	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos	Acúmulo de proteína solúvel total

3.6. Produção de toxinas Cry com atividade intensificada: Evolução molecular *in vitro*

Avanços nas técnicas de biologia molecular e nas técnicas aplicadas na área de biotecnologia permitiram que a recombinação gênica fosse empregada em experimentos de evolução molecular *in vitro* para o desenvolvimento de novas sequências de DNA e moléculas de proteínas (Peng *et al.* 2004). A aplicação desta metodologia permite a construção de bibliotecas de ácidos nucleicos, a partir das quais as proteínas possam ser traduzidas (Neylon 2004).

Os métodos para a construção de bibliotecas de DNA por evolução dirigida *in vitro* podem ser divididos em três categorias. A primeira categoria envolve técnicas onde as alterações são feitas ao acaso dentro de um conjunto de genes, utilizando-se de ferramentas como o “error-prone PCR (epPCR)”.

A segunda consiste de métodos que envolvem randomização em posições específicas dentro de uma sequência gênica, como por exemplo, o processo de extensão escalonado (StEP), no qual porções de sequências conhecidas são fragmentadas e misturadas em novas combinações (Zhao *et al.* 1998).

Na terceira categoria, por sua vez, estão as técnicas de recombinação, nas quais não se cria diretamente diversidade na sequência, mas combinam a diversidade existente de novas maneiras. Dentre esta última categoria de técnicas, destaca-se a de *DNA shuffling*, que consiste das seguintes etapas: (i) isolamento do(s) gene(s) a ser(em) fragmentado(s); (ii) digestão aleatória de um ou mais genes com a enzima DNase I, resultando em um conjunto de fragmentos de DNA de tamanhos variados; (iii) remontagem desses fragmentos em genes completos por PCR, sem adição de oligonucleotídeos iniciadores e, (iv) nova PCR, adicionando oligonucleotídeos iniciadores com sítios de restrição para facilitar a subclonagem em vetores específicos (Stemmer 1994b) (Figura 7).

A técnica de *DNA shuffling* tem sido utilizada para diversos fins, com objetivo de se obter moléculas com características desejadas, como a melhoria da cinética enzimática, geração de novas especificidades para determinados substratos, formação de novos produtos ou modificação de enzimas para desempenho ótimo em ambientes específicos (Lassner and Bedbrook 2001). Exemplos apresentando sucesso na aplicação dessa técnica incluem o aumento da atividade hidrolítica de uma quitinase do fungo *Beauveria bassiana* (Fan *et al.* 2007), a toxicidade adquirida da toxina quimérica Cry1Ba/Cry1Db contra *Epiphyas postvittana* (Knight *et al.* 2004) e a criação de

proteínas quiméricas, partindo de genes da família do interferon- α humano, que apresentam maior atividade em células de camundongo que o respectivo interferon- α murino (Chang *et al.* 1999).

Os procedimentos originalmente descritos para a técnica de *DNA shuffling* (Stemmer 1994a; Stemmer 1994b; Zhao and Arnold 1997) envolveram a digestão aleatória de genes de várias famílias e a remontagem dos mesmos em genes quiméricos. No entanto, diversas adaptações do método original têm surgido, com o objetivo de aumentar diversidade dos mutantes gerados. Exemplificando, enzimas de restrição (Kikuchi *et al.* 1999) ou endonuclease V (Miyazaki 2002) foram aplicadas nos substratos de DNA fita dupla, na tentativa de aumentar a variabilidade genética das novas moléculas geradas.

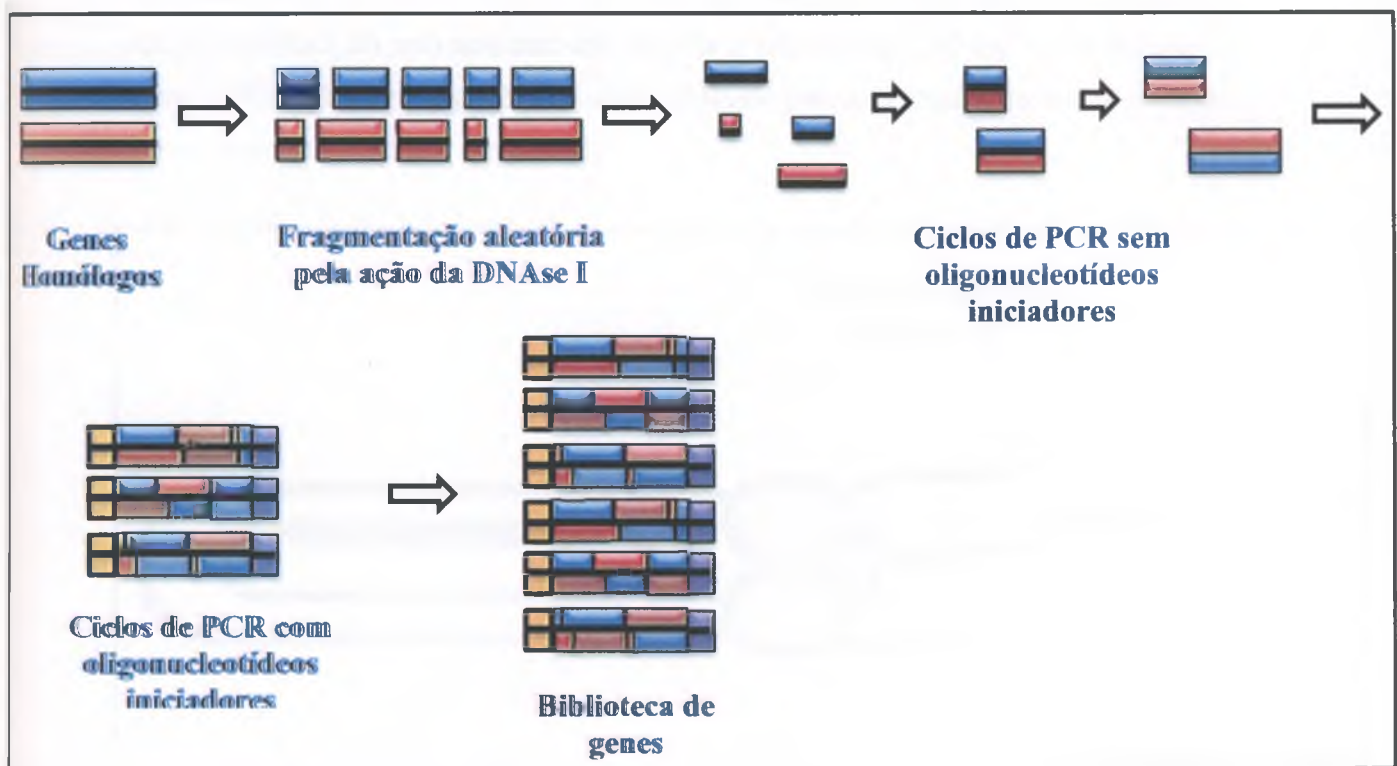


Figura 7. Esquema ilustrando a recombinação *in vitro* via *DNA shuffling*.

Apesar da eficiência comprovada da técnica de *DNA shuffling*, a mesma é um método bastante laborioso, onde diversos fatores devem ser levados em consideração durante a sua realização, os quais podem alterar o resultado final. Muitas vezes, é necessário aperfeiçoar as condições das reações para obter o DNA recombinado completo (An *et al.* 2011).

Uma variação da técnica de *DNA shuffling* resultou no SPOP (“*Shuffled Proteins on Phages*”) que consiste de ciclos consecutivos de *DNA shuffling*, seguido de *Phage display* e seleção funcional (Stoop *et al.* 2000). A técnica de *Phage display* envolve a expressão de proteínas ou peptídeos na superfície de fagos filamentosos, sendo apresentadas como um produto de fusão a uma das proteínas da capa protéica de um bacteriófago (Willats 2002) (Figura 8).

Essa técnica constitui uma das opções para a seleção de proteínas ou peptídeos recombinantes, apresentando êxito para selecionar peptídeos ou proteínas com propriedades específicas de ligação (Smith 1985), estudar interações proteínas-ligantes (Cesareni 1992) e alterar a afinidade de proteínas por seus ligantes (Neri *et al.* 1995). Vários tipos de fagos já foram utilizados na seleção de proteínas Cry: a toxina Cry1Ac foi fusionada na proteína D do capsídeo do fago lambda, (Fernández *et al.* 2008), e a toxina Cry8Ka5 foi corretamente apresentada e selecionada em fagos filamentosos, como o M13 (Oliveira *et al.* 2011), sendo utilizada para a evolução molecular *in vitro* dessas proteínas (Craveiro *et al.* 2010).

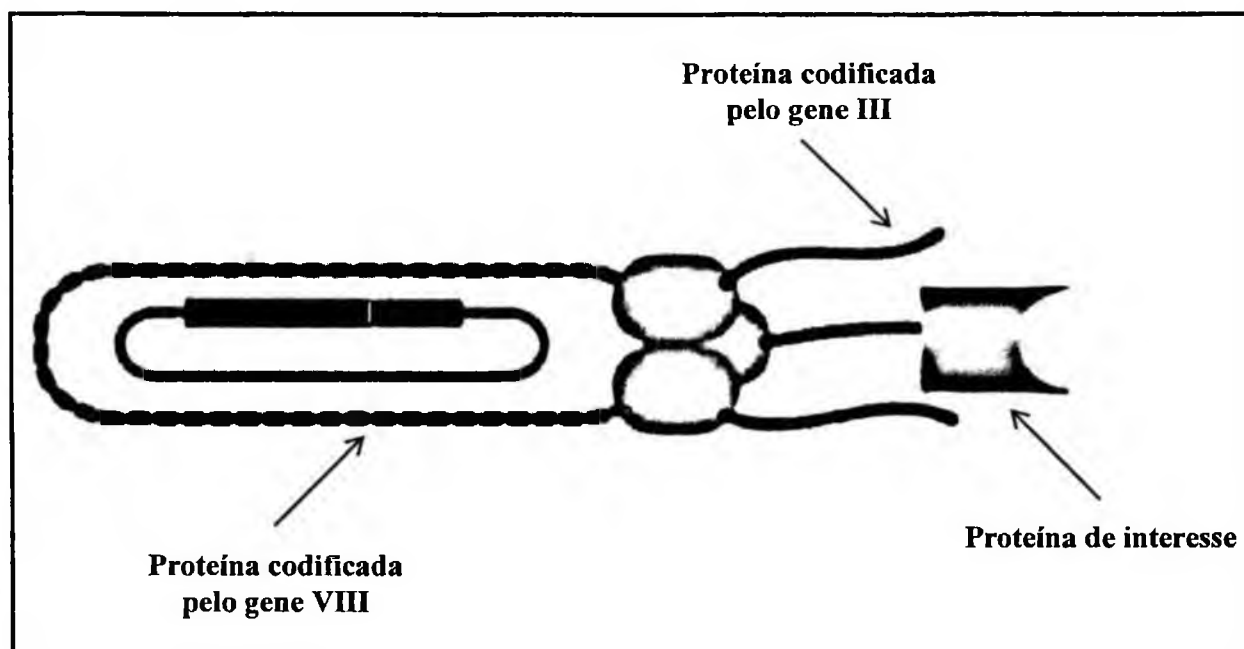


Figura 8. *Phage display*. A proteína de interesse é apresentada na superfície do fago, sendo fusionada a proteína codificada pelo gene III ou gene VIII. Adaptado de Matsuura e Yomo, 2006.

Na aplicação de *Phage display* utilizando o fago filamentosso M13, o DNA que codifica a proteína ou o peptídeo de interesse é ligado ao gene III ou VIII, que codificam as proteínas do capsídeo III e VIII, respectivamente. Muitas vezes, múltiplos sítios de clonagem são utilizados para garantir que os fragmentos sejam inseridos nas

três fases de leitura possíveis, assegurando que o fragmento de DNA seja traduzido na fase de leitura correta. A fusão gene do fago-DNA inserido é então transformada em células de *E. coli*. Quando um fagomídeo é utilizado, as partículas de fagos não serão liberadas das células de *E. coli* até serem infectadas por um fago auxiliar, que permite o empacotamento do DNA do fago e montagem dos vírions maduros, com a proteína de interesse como parte de seu capsídeo ligado a proteína pIII ou pVIII. A incorporação de diferentes fragmentos DNA nos genes pIII ou pVIII gera uma biblioteca, da qual as proteínas de interesse podem ser isoladas (Smith 1985; Smith and Petrenko 1997).

No presente trabalho, a combinação das técnicas de *DNA shuffling* e *Phage display* foi utilizada para explorar a grande diversidade de mutantes, apresentados em bibliotecas de fagos, expressando proteínas funcionais, as quais foram selecionadas por afinidade a BBMV's específicas ao inseto-alvo. Inicialmente, foram avaliadas cepas de *Bt* na prospecção de genes *cry* apresentando atividade contra insetos lepidópteros. A partir daí, foram selecionados variantes dos genes *cryIAa* (Schnepf *et al.* 1985) e *cryIIa12* (Grossi-de-Sa *et al.* 2007). Posteriormente, os novos genes serão utilizados na obtenção de plantas de cana-de-açúcar resistentes ao principal inseto-praga da planta (*T. l. licus*).

4. HIPÓTESE

Ao recombinar genes *cry* com especificidade para lepidópteros, aplicando evolução molecular *in vitro* (*DNA shuffling* e *Phage display*), é possível gerar novas moléculas com atividade tóxica intensificada para a broca gigante da cana de açúcar (*Telchin licus licus*).

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo geral

Gerar e selecionar variantes de toxinas Cry por *DNA shuffling* e *Phage display*, com potencial para uso no controle da broca gigante da cana-de-açúcar (*T. l. licus*).

5.2. Objetivos específicos

Conduzir bioensaios com cepas de *Bt* padrão e larvas de *T. l. licus*;

Conduzir bioensaios com genes *cry* recombinantes e larvas de *T. l. licus*;

Construir duas bibliotecas combinatórias com variantes das toxinas Cry1Aa e Cry1Ia12;

Selecionar as variantes Cry com afinidade para proteínas receptoras do intestino médio (*BBMVs*) da broca gigante da cana-de-açúcar;

Validar as novas moléculas de toxinas Cry por meio de bioensaios;

Analisar a estrutura-função das novas moléculas relativa às mutações geradas.

6. MATERIAIS E MÉTODOS

Os meios de cultura, soluções e tampões estão descritos nos anexos I e II.

6.1. Linhagem bacteriana, vetores, fagomídeo e fago auxiliar

Foi utilizada a linhagem bacteriana *E. coli* XL-1 Blue para as etapas de transformação, produção de partículas virais, amplificação e seleção de fagomídeos. O fagomídeo utilizado para a clonagem da população de genes para variantes das toxinas Cry1Aa e Cry1Ia12 foi o pCOMB3X (Andris-Widhopf *et al.* 2000). Esse fagomídeo possui um códon âmbar (UAG) entre a extremidade 3' do sítio de restrição *Sfi* I e a extremidade 5' do gene III, permitindo a expressão de proteínas solúveis em cepas bacterianas não supressoras, sem a excisão do gene III; uma sequência com seis histidinas (6X-HIS) para facilitar a purificação de proteínas solúveis e uma sequência decapeptídica hemaglutinina (HA) inserida na extremidade 3' da sequência 6-HIS visando à detecção com anticorpo anti-HA.

Para a expressão em fagos, foi utilizado o bacteriófago VCSM13, derivado do bacteriófago M13. Sua preparação seguiu o protocolo descrito por Barbas III *et al.*, (1991). E, para propiciar a subclonagem dos genes *cry* selecionados por *biopanning* em um sistema de expressão homólogo, foi utilizado o vetor pSVP27A.

6.2. Obtenção dos Insetos

O material biológico deste estudo foram insetos em seus primeiros instares de desenvolvimento obtidos de ovos coletados de fêmeas de *T. l. licus* nos canais da usina Triunfo, situada em Alagoas. Em laboratório, as larvas eclodiram e foram mantidos em dieta artificial (caseína 2%, extrato de levedura 1%, açúcar branco 6%, ácido ascórbico 1%, vitaminas 1,1%, mistura de sais de Wesson 0,75% (Walmon[®]), colesterol 0,03%, cloreto de colina 0,3% e água) em câmara insetária na EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, até o momento de sua utilização.

6.3. Obtenção e preparação dos intestinos médios das larvas de *T. l. licus*

As larvas de *T. l. licus* foram colocadas em uma placa de Petri e os intestinos retirados com o auxílio de uma lâmina de bisturi, sendo depositados em tampão MET pH 7,5 contendo PMSF 1 mM. Os intestinos foram transferidos para um tubo (tipo corex 50 mL) contendo o mesmo tampão, então homogeneizados e centrifugados a 2500

x g por 5 minutos, a 4°C. O precipitado foi solubilizado em tampão MET pH 7,5 contendo PMSF 1 mM e a centrifugação foi repetida. Após solubilização, o precipitado foi dividido em alíquotas, congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C.

6.4. Preparação das BBMV's (*Brush Border Membrane Vesicles*)

A extração das proteínas receptoras presentes nas vesículas dos intestinos médios (BBMV's) das larvas de *T. l. licus* foi realizada de acordo com protocolo adaptado (Wolfersberger *et al.* 1987). Os intestinos médios, obedecendo a uma relação peso/volume de 1/10, foram solubilizados em tampão MET pH 7,5, PMSF 1 mM e foi adicionado igual volume de MgCl₂ 24 mM. Foram realizadas cinco centrifugações, três a 2500 x g por 15 minutos e duas a 30000 x g por 40 minutos, ambas a 4°C. O sobrenadante foi sempre recuperado, até a última centrifugação, e o precipitado final foi solubilizado em tampão TBS pH 7,4, congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C.

6.5. Ensaio enzimáticos

As atividades de fosfatase alcalina e leucina aminopeptidase, nas preparações de BBMV's, foram determinadas por espectrofotometria utilizando 4-nitrofenil fosfato (pNPP) em tampão dietalonamina, L-leucine-β-naphtilamida e o cromóforo *Fast Black K*, respectivamente (Sigma, St. Louis, MO).

Para determinar a atividade da fosfatase alcalina, cinco microlitros (1,5 µg) de BBMV's foram adicionados a 200 µL de pNPP 1 mg/mL em tampão dietalonamina 1 M, incubado em temperatura ambiente por 12 minutos. Em paralelo, para a atividade da leucina aminopeptidase foram utilizados cinco microlitros (1,5 µg) de BBMV's (em tampão fosfato pH 7,0) e incubado a 37°C por 15 minutos (Valencia 2009). Ao material incubado foram adicionados cinco microlitros de *Fast Black K* 24 mM e cinco microlitros de L-leucina-β-naphtilamida 14 mM. A leitura das absorbâncias a 405 nm (para ensaio com fosfatase) e a 595 nm (para leucina aminopeptidase) foram realizadas a cada minuto, durante 5 minutos em temperatura ambiente. Os resultados foram utilizados para calcular as atividades específicas das enzimas, em cada tempo, onde uma unidade de atividade da enzima (UI) foi definida como sendo o incremento de 0,01 nas absorbâncias a 405 e 595 nm.

6.6. Estirpes de *Bacillus thuringiensis*

Para a realização de bioensaios contra larvas de *T. l. licus*, foram utilizadas quatro estirpes de *Bt* da coleção de cepas da EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia: sorovariedade *kurstaki* – S2195 e S1905 e sorovariedade *tolworthi* – S135 e S62. Os genes *cry* presentes nas estirpes de *Bt* sor. *kurstaki* foram doados pelo Dr. Colin Berry (Universidade de Cardiff), encontrando-se armazenados no Banco de *Bacillus spp.* da EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia.

6.7. Bioensaios contra larvas de *T. l. licus*

Devido à característica de canibalismo das larvas de *T. l. licus* e a impossibilidade de trabalhar com os insetos em laboratório, foi necessário o desenvolvimento de uma metodologia para a realização dos bioensaios. Foram utilizadas placas de microtitulação de 96 poços, para que as larvas ficassem individualizadas. Cada poço do experimento continha uma esponja (80% de viscosa, 20% de poliéster) com, aproximadamente 1 cm², previamente embebida em suspensão de dieta líquida, com esporos e cristais (1 mg/mL) de cada estirpe a ser testada ou 3,5 µg de toxinas Cry expressas em bactéria, conforme cada caso. O tratamento-testemunha foi realizado com dieta sem nenhuma bactéria. Os experimentos foram realizados em triplicata em que cada unidade experimental consistia de 12 larvas de 1º instar, individualizadas em cada poço contendo os diferentes tratamentos.

As placas foram mantidas em câmara climatizada a 28±1°C, UR 70±10% e fotoperíodo de 12 horas. Após cinco dias, o experimento foi interrompido para a avaliação de mortalidade larval dos diferentes tratamentos. Os valores de mortalidade foram comparados utilizando-se de análise de variância pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5%.

6.8. Ensaio de Permeabilidade das BBMV's de *T. l. licus*

As propriedades de permeabilidade das BBMV's foram estudadas usando um ensaio de dilatação osmótica que monitora mudanças de volume das vesículas após o encolhimento em soluções de soluto hiperosmótico (Kasai and Nunogaki 1988). A preparação de BBMV's de *T. l. licus* foi diluída em tampão TBS pH 7,4 após sua preparação (Wolfersberger *et al.* 1987) e quantificada pelo método de Bradford (1976), utilizando BSA como curva padrão.

Em cada tratamento, KCl 0,6M, Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ia12, Cry2Aa e Cry8Ka5, foram adicionados tampão glicina 10 mM pH 9,5 com BSA 1 mg/mL, 400 µg/mL de BBMV's e 1 µg/mL de cada toxina Cry. Em seguida, foi realizada uma incubação a 25°C por 1 hora. Após a adição de uma solução hiperosmótica (KCl 0,6 M em tampão glicina 10 mM pH 9,5), o monitoramento do balanço osmótico das BBMV's de *T. l. licus* foi realizado por espalhamento de luz a 90°, utilizando o Espectrofotômetro de Fluorescência F-7000 (Hitachi®), com excitação e emissão a 450 nm. Como controle negativo, foi utilizada a toxina Cry8Ka5, por ser uma toxina disponível em nosso laboratório e ser específica para insetos coleópteros (Oliveira *et al.* 2011).

6.9. DNA Shuffling

Primeiramente, os genes *cry1Ia12* (Grossi-de-Sa *et al.* 2007) e *cry1Aa* (Schnepf *et al.* 1985) escolhidos como substratos para recombinação utilizando a técnica de *DNA shuffling* foram amplificados por PCRs, com o objetivo de: a) inserir sequências para sítio de restrição *Sfi* I, a fim de auxiliar a subclonagem no fagomídeo pCOMB3X (Andris-Widhopf *et al.* 2000); b) inserir uma “sequência âncora” na extremidade 5' dos genes, para eliminar tendências de sequências gênicas durante a amplificação dos variantes, após a recombinação e c) inserir sítios de *Bam* HI (*forward*) e *Sph* I (*reverse*), para a subclonagem no vetor pSVP27A (Crickmore and Ellar 1992), o qual é apropriado para expressão homóloga em *Bacillus thuringiensis* var. *israelenses*. O sítio para a enzima tripsina foi utilizado para que, durante a ativação da toxina Cry no intestino do inseto, a mesma seja liberada da proteína de fusão do fago auxiliar, facilitando sua absorção (Pacheco *et al.* 2006). Na figura 9, é mostrado um esquema com indicação nas sequências dos oligonucleotídeos iniciadores, sobre a estratégia aplicada:

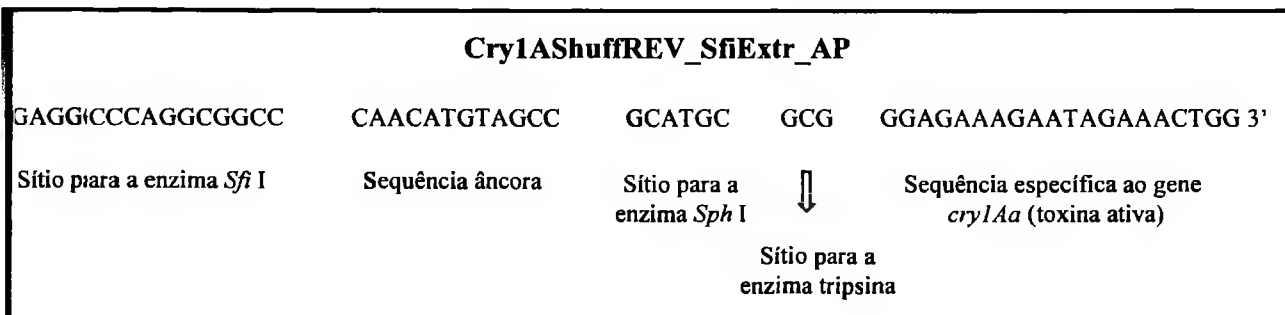


Figura 9. Sequência de um oligonucleotídeo iniciador utilizado no *DNA shuffling*, mostrando a estratégia utilizada.

Para as PCRs, foram utilizados 200 ng dos DNAs (genes *cry1Aa* e *cry11a12*), obtidos por minipreparações de DNA plasmidial para o volume final de 500 μ L (10 reações com 50 μ L cada), contendo os oligonucleotídeos iniciadores 1-4 (Tabela 7), dNTPs 0,4 mM, $MgCl_2$ 3 mM, 0,15 μ M de cada oligonucleotídeo iniciador, *Taq* DNA Polimerase 1,5 U (Cenbiot[®]), em Tampão DNA Polimerase 1X. As condições das PCRs foram: 2 minutos a 95°C, 35 ciclos: 45 segundos a 95°C, 45 segundos a 60°C e 2 minutos a 72°C, com uma extensão final de 5 minutos a 72°C. Uma alíquota dos produtos das PCRs foi analisada em gel de agarose 1% e o restante foi purificado utilizando o kit QIAquick[®] PCR Purification Kit (QIAGEN).

Para a fragmentação dos genes *cry*, foi utilizada a DNase I, a qual digere amostras de DNA fita simples e dupla produzindo oligodesoxiribonucleotídeos contendo fosfato 5' e hidroxila 3', com fragmentos de tamanhos aleatórios, dependendo das condições utilizadas para a reação (Kikuchi *et al.* 2000; Lutz *et al.* 2001).

Vinte microgramas de cada um dos genes *cry1Aa* e *cry11a12* amplificados nas PCRs acima descritas foram liofilizados, ressolubilizados em tampão de DNase I e digeridos com 30 U de DNase I a 15°C por 20 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 5 μ L de EDTA 0,5 M. Uma alíquota do produto da digestão foi analisada em gel de agarose 2,5%. O restante do produto da digestão foi purificado utilizando colunas Microcon[®] YM-100 (Millipore), seguindo as instruções do fabricante visando a recuperação de fragmentos de até 125 pb.

Dez microlitros (aproximadamente 1,3 μ g) de cada conjunto de fragmentos purificados (*cry1Aa* e *cry11a12*) foram utilizados como molde na PCR sem adição de oligonucleotídeos iniciadores (volume final de 25 μ L) contendo dNTPs 0,4 mM, $MgSO_4$ 1 mM e *Taq* Platinum DNA Polimerase High Fidelity (Invitrogen) 2,5 U, em Tampão Platinum DNA Polimerase High Fidelity 5X. As condições para esta PCR

foram: 2 minutos a 95°C, 44 ciclos: 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 42°C e 1 minuto a 72°C (com um acréscimo de 5 segundos no tempo de extensão a cada ciclo), com uma extensão final de 7 minutos a 72°C. O produto dessa reação (1,5 µL) foi utilizado na segunda PCR contendo os oligonucleotídeos iniciadores 5 e 6 (Tabela 7). A reação foi realizada com o volume final de 50 µL, contendo dNTPs 0,2 mM, MgSO₄ 2 mM, 0,8 µM de cada oligonucleotídeo iniciador, *Taq* Platinum DNA Polimerase High Fidelity 5 U (Invitrogen) e *Taq* DNA Polimerase 5 U (Cenbiot®), em Tampão Platinum DNA Polimerase High Fidelity 1X. As condições para essa PCR foram: 2 minutos a 95°C; 10 ciclos: 30 segundos a 95°C, 1 minuto a 42°C e 1 minuto a 72°C; 14 ciclos: 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 42°C e 1 minuto a 72°C (com um acréscimo de 20 segundos no tempo de extensão a cada ciclo), com uma extensão final de 10 minutos a 72°C. Dessa forma, o produto obtido pela aplicação do *DNA shuffling* foram analisados em gel de agarose 1% e o amplicon de aproximadamente 2000 pb, correspondendo às populações dos variantes *cry1Aa* e *cry1Ia12*, foram excisadas e purificadas com o QIAquick® Gel Extraction Kit (QIAGEN).

Tabela 7. Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores específicos utilizados durante o *DNA shuffling*

Número do Oligonucleotídeo Iniciador	Oligonucleotídeo iniciador	Sequência
1	Cry1AaShuffFOR_SfiExtr_AP	5' CGAGGCCAGGCGGCCAGTAGTGGCGTG TCAGGATCCGGAGAAAGAATAGAAACTGG 3'
2	Cry1IaShuffFOR_SfiExtr_AP	5' CGAGGCCAGGCGGCCAGTAGTGGCGTG TCAGGATCCTGTTTGAAAATGTCTGAG 3'
3	Cry1AaShuffREV_SfiExtr_AP	5' CGAGGCCGGCCTGGCCCAACATGTAGCCG CATGCGGATATTCTGCCTCAAAGGTTAC 3'
4	Cry1IaShuffREV_SfiExtr_AP	5' CGAGGCCGGCCTGGCCCAACATGTAGCCG ATGCGGTTCTACCGGAACAAATTCAATTC 3'
5	Shuff2FOR_SfiExtr_AP	5' CGAGGCCAGGCGGCCAGTAGTGGCGTGCAGGATCC 3'
6	Shuff2REV_SfiExtr_AP	5' CGAGGCCGGCCTGGCCCAACATGTAGCCGATGCGCG 3'

6.10. Subclonagem dos genes *cry1Aa* e *cry1Ia12* e seus variantes no fagomídeo pCOMB3X

O vetor pCOMB3X, os genes parentais *cry1Aa* e *cry1Ia12* e o DNA purificado do gel correspondendo à população de variantes dos genes *cry1Aa* e *cry1Ia12* (*DNA shuffling*) foram submetidos à digestão com enzima de restrição *Sfi* I. Foram utilizados

2 µg de DNA do vetor, tampão NEB2 1X, BSA 1 mg/mL e 40 U *Sfi* I (Biolabs®), para o volume final de reação de 40 µL. A reação ocorreu a 50°C durante 2 horas. As mesmas condições foram utilizadas para digerir os genes *cry*. Os produtos das digestões foram analisados em gel de agarose 0,8% e as bandas correspondentes ao vetor pCOMB3X linearizado (aproximadamente 3000 pb) e aos genes *cryIAa* e *cryIIa12* (aproximadamente 2000 pb) foram excisadas do gel e purificadas com o QIAquick® Gel Extraction Kit (QIAGEN). Foram realizadas várias reações de digestão e purificação visando uma quantidade mínima de 10 µg. Para clonagem no pCOMB3X, adicionou-se o vetor e os genes *cry* foram misturados na proporção de 4:1 (vetor:inserto), adicionados tampão da enzima T4 DNA Ligase 1X, enzima T4 DNA Ligase (Invitrogen®) 1U e ATP 20 mM, para o volume final de 25 µL, foram mantidos a 15°C por 16 horas.

O produto da ligação (pCOMB3X + *cryIAa* e pCOMB3X + *cryIIa12*) foi utilizado para transformar células *E. coli* XL-1 Blue, via eletroporação (Figura 10). As colônias crescidas em meio LB contendo ampicilina 100 mg/mL foram analisadas por PCRs de colônia. Os DNAs das colônias apresentando o transgene foram preparados e as sequências determinadas utilizando os oligonucleotídeos iniciadores 9-14 (Tabela 9).

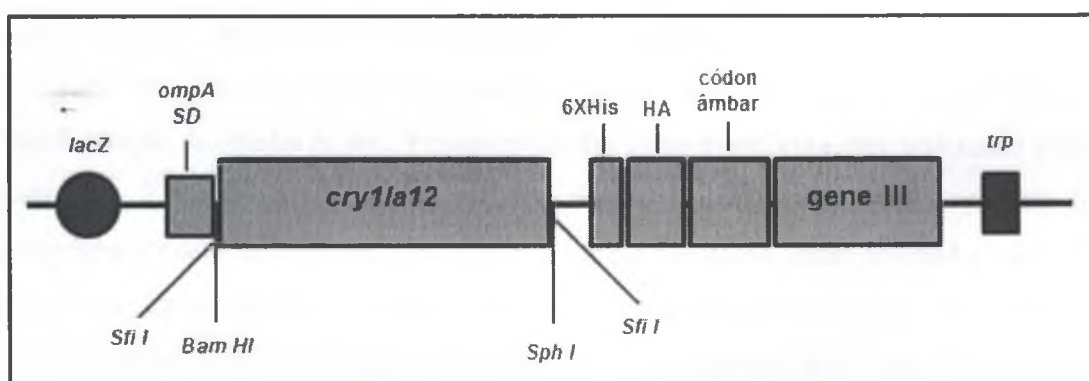


Figura 10. Representação esquemática da construção do fagomídeo pCOMB3X-*cryIIa12*, para expressar a *CryIIa12* na superfície do fago filamentoso M13. *LacZ* – Operon induzível; *SD* – Sítio *Shine Dalgarno* de ligação ao ribossomo que leva à separação de polipeptídeos que são direcionados ao periplasma pelo peptídeo sinal *ompA*; *Sfi I*, *Bam HI* e *Sph I* – sítios de enzimas de restrição; *cryIIa12* – gene a ser expresso em fusão com a proteína III do fago VCSM13; **6XHis – sequência inserida para purificação universal de proteínas; **HA** – decapeptídeo hemaglutinina inserido na extremidade 3' da cauda de histidina para detecção usando um anticorpo anti-HA; **Códon âmbar** – permite a expressão de proteínas solúveis em cepas de bactérias não-supressoras sem a excisão do produto do gene III; **Trp** – terminação da transcrição. Figura adaptada de Barbas III *et al.* 2001.**

6.11. Construção da biblioteca combinatória (tipo *Phage display*) contendo os genes para variantes Cry1Aa e CryIIa12

Para a seleção das variantes Cry1Aa e CryIIa12 geradas por *DNA shuffling* (Stemmer 1994b; Zhao and Arnold 1997), primeiramente foi construída uma biblioteca combinatória apresentando as variantes na superfície de fagos filamentosos, de acordo com a técnica de *Phage display* (Barbas III *et al.* 2001). O procedimento de seleção (*biopanning*) consiste de quatro etapas: (a) ligação dos fagos ao ligante imobilizado em placa, (b) lavagens sucessivas para eliminação dos fagos inespecíficos, (c) eluição ácida para coletas de fagos específicos mostrando forte afinidade pelo ligante e (d) amplificação dos fagos selecionados por novos ciclos de infecção de cultura bacteriana. As variantes Cry foram selecionadas por apresentarem afinidade pelas proteínas das vesículas de membrana do intestino médio (BBMVs) da broca gigante da cana-de-açúcar (*T. l. licus*), extraídas conforme (Wolfersberger *et al.* 1987).

6.11.1. Transformação de células *E. coli* XL-1 Blue, por eletroporação e construção da biblioteca combinatória

Para construção da biblioteca, o DNA do fagomídeo (7,5 µg) contendo a população de variantes (descrito no item 6.10) foi inicialmente precipitado com acetato de sódio 3M pH 5,2 (1/10 v) e etanol 100% (2 v), lavado duas vezes com 1 mL de etanol 70%, seco a vácuo e ressuspendido com 15 mL de H₂O foi utilizado para a transformação de células *E. coli*. Foram realizadas cinco transformações, utilizando para cada uma 3 µL do produto da ligação e 60 µL de células competentes. Para o procedimento de transformação das bactérias por eletroporação foram utilizadas cuvetas de 0,2 cm. Os parâmetros utilizados para os choques foram 2,5 kV, 25 µF e 200 Ω. Após o choque, as células foram recuperadas com 3 mL de meio SOC, transferidas para um tubo de polipropileno (tipo Falcon - 50 mL) estéril e incubadas a 37°C, por 1 hora, sob agitação constante de 250 rpm. Em seguida, o produto das transformações (15 mL) foram transferidos para um erlenmeyer de 125 mL. Uma alíquota do cultivo (300 µL) foi coletada e plaqueada em meio LB Ágar, contendo carbenicilina [100 µg/mL], para a contagem de colônias e titulação da biblioteca. Ao restante do cultivo foram adicionados 30 mL de meio SB pré-aquecido a 37°C, 9 µL de carbenicilina [100 mg/mL] e 90 µL de tetraciclina [5 mg/mL], seguido de incubação a 37°C, por 1 hora, sob agitação de 250 rpm. Em seguida foram adicionados 13,5 µL de carbenicilina [100

mg/mL] e a cultura foi incubada por mais uma 1 hora, nas mesmas condições. Acrescentou-se 155 mL de meio SB pré-aquecido a 37°C, 77,5 µL de carbenicilina [100 mg/mL], 310 µL de tetraciclina [5 mg/mL] e 2 mL de fago auxiliar [VCSM13 – 6,09 x 10¹³ pfu/mL]. As células foram incubadas a 37°C por 2 horas, sob agitação de 300 rpm. Finalmente, foram adicionados 280 µL de canamicina [100 mg/mL] e a cultura foi incubada a 37°C, sob agitação de 300 rpm, por aproximadamente 16 horas.

6.11.2. Seleção das variantes dos genes *cryIAa* e *cryIIa12* (*biopanning*) partindo da biblioteca combinatória

Foram retiradas quatro alíquotas de 1 mL do cultivo (item 6.11.1) e centrifugadas a 3300 x g, por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e guardado a 4°C e o sedimento estocado a -20°C, para utilização em futuras preparações de DNA plasmidial. O restante do cultivo foi centrifugado a 2000 x g, por 20 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi transferido para novo frasco corex e os fagos foram precipitados com adição a 20 mL de PEG/NaCl, incubação de 30 minutos no gelo, seguido de centrifugação a 2000 x g, por 80 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o tubo invertido sobre papel toalha (eliminar o excedente de meio), por 10 minutos. O sedimento foi ressuspenso com 1 mL de solução TBS/BSA 1% (p/v), e após centrifugação a 15000 x g, por 5 minutos a 4°C, o sobrenadante, contendo as partículas virais (“preparação de fagos”), foi transferido para um microtubo e mantido a 4°C. Em paralelo, visando a utilização na reamplificação dos fagos por infecção da cultura bacteriana, 5 µL de células *E. coli* eletrocompetentes foram adicionadas a 5 mL de meio SB pré-aquecido e incubadas a 37°C, sob agitação constante de 250 rpm, até atingir a densidade óptica (DO_{600 nm}) aproximadamente 1,0 (Barbas III *et al.* 2001).

Em continuidade ao *biopanning*, dois poços de placas de microtitulação (96 poços) foram sensibilizados com 100 µg cada de BBMV's extraídas de lagartas de *T. l. licus* e diluídas em tampão TBS. A placa foi incubada a 4°C, por 16 horas. Após este período, a placa foi incubada a 37°C, em estufa, por 1 hora. Cada um dos poços foi lavado com 150 µL de PBS-Tween 0,1% e, em seguida, foi adicionado o mesmo volume de TBS-BSA 3%, com o objetivo de bloquear ligações inespecíficas na superfície dos poços. A placa foi incubada a 37°C, por 1 hora. A solução de bloqueio foi descartada, os poços foram lavados por três vezes com 150 µL de PBS/Tween 0,1%. Adicionou-se 100 µL da preparação de fagos (descrito acima). A placa foi incubada a

37°C, por 2 horas. Em seguida, foram realizados sucessivos ciclos de lavagens dos poços, com adição de 150 µL de PBS/Tween 0,1%, visando em cada ciclo, à eliminação dos fagos inespecíficos (afinidade baixa ao ligante – BBMV's). Após sucessivas lavagens, os fagos foram eluídos dos poços utilizando 100 µL do tampão Glicina-HCl 0,1 M pH 2,2, e em seguida neutralizados com adição de 12 µL de Tris-base 2 M.

Para reamplificação dos fagos eluídos, uma alíquota de 106 µL foi utilizada para infectar 2 mL de cultivo de células de *E. coli* XL-1 *Blue* competente (obtido conforme descrito acima). A infecção ocorreu em temperatura ambiente, durante 15 minutos. Posteriormente, o cultivo foi adicionado ao tubo (Falcon® - 50 mL) contendo 6 mL de meio SB pré-aquecido a 37°C, 320 µL de Glicose 50%, 1,6 µL de carbenicilina [100 mg/mL] e 12 µL de tetraciclina [5 mg/mL]. Deste cultivo, foi retirada uma alíquota de 200 µL (para posterior plaqueamento em meio LB_{Ágar} com carbenicilina [100 mg/mL]) e determinação do cálculo do título de fagos coletados (“título de saída” ou *output*) e o restante do cultivo, foi incubado a 37°C, por 1 hora, sob agitação de 300 rpm. Após uma hora de incubação, foram acrescentados ao cultivo 2,4 µL de carbenicilina [100 µg/mL] e incubou-se por mais uma hora, nas mesmas condições de temperatura e agitação. Os oito mililitros de cultivo foram transferidos para um erlenmeyer de 500 mL, contendo 91 mL de meio SB pré-aquecido, 1 mL de fago auxiliar VCSM13 [10^{12} pfu/mL], 46 µL de carbenicilina [100 mg/mL], 184 µL de tetraciclina [5 mg/mL] e incubado a 37°C, por 2 horas, sob agitação de 300 rpm. Depois deste tempo, foram adicionados ao cultivo 70 µL de canamicina [100 mg/mL] e a cultura foi incubada a 37°C, durante aproximadamente 16 horas, sob agitação de 300 rpm. No Anexo III, há um esquema simplificado do procedimento de *biopanning*, que nos auxiliou na sua execução.

O *input* representa o número de fagos que foi posto em contato com o ligante (BBMV's) a cada ciclo e, o *output*, o número de fagos eluídos (dos ligantes BBMV's, adsorvidos à placa) que foram selecionados em cada ciclo. A titulação dos fagos foi monitorada pela contagem de colônias bacterianas crescidas (UFC – Unidades Formadoras de Colônias), em meio LB Ágar contendo carbenicilina [100 mg/mL] após incubação a 37°C, por 16 horas. O(s) ciclo(s) apresentando o maior número de colônias bacterianas é indicado como o ciclo onde ocorreu o enriquecimento dos fagos específicos (Barbas III *et al.* 2001).

6.12. PCRs de colônia

Quatrocentos clones isolados, coletados do ciclo de seleção, indicado como o de maior enriquecimento de fagos específicos, foram analisados quanto à integridade do gene (1944 pb) utilizando PCR. As colônias apresentando o amplicons com o tamanho esperado foram selecionadas e as moléculas individualmente expressas em sistema de fagos (descrito a seguir). Para as PCRs foram adicionados o material de uma colônia a cada microtubo contendo os oligonucleotídeos iniciadores 7 e 8 (Tabela 8). As PCRs foram realizadas num volume final de 20 μ L, contendo dNTPs 0,15 mM, $MgSO_4$ 2,0 mM, 0,15 μ M de cada oligonucleotídeo iniciador, *Taq* DNA Polimerase 1,5 U (*Phonutria*), em tampão da *Taq* DNA Polimerase 1X. O volume final da reação foi de 20 mL. A programação utilizada foi desnaturação a 95°C por 2 min, seguida de 35 ciclos (95°C por 45 s, 69°C por 45 s e 72°C por 2 min) e extensão final foi de 72°C, por 5 min. O produto da reação foi analisado após eletroforese em gel de agarose 0,8%.

Tabela 8. Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores específicos utilizados durante as PCRs de colônia

Número do Oligonucleotídeo Iniciador	Oligonucleotídeo Iniciador	Sequência
7	pCOMB_FOR	5' CACCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGACCACAATAA CTTAAGAAGGAGATAGGCTTATGGCTGGTTTCGCTACCGTG 3'
8	pCOMB_REV	5' GCTTTCAGCAAAAAACCCCTCAAGACCGTTTAGAGGCCCAAG GGTTATTATATAGTTTAACTCAGTATGCGCCATGGTGTATG 3'

6.13. Obtenção das toxinas Cry1IaI2 e das variantes selecionadas por *Phage display*

6.13.1. Apresentação dos genes parental e variantes na superfície de fago auxiliar VCSM13

Os genes que codificam para as toxinas utilizadas neste estudo e os genes variantes (1944 pb) selecionados após PCR de colônia foram utilizados para inoculação e obtenção da expressão no sistema de fago utilizando o fago auxiliar VCSM13. Primeiramente, as colônias selecionadas foram crescidas em meio SB contendo carbenicilina [100 mg/mL] após incubação a 37°C, 200 rpm, por 16 horas. No dia seguinte, foi adicionado meio SB, fago auxiliar VCSM13 e os antibióticos carbenicilina [100 mg/mL], tetraciclina [5 mg/mL] e canamicina [100 mg/mL], como

agentes seletivos. O inóculo foi incubado a 37°C, sob agitação de 250 rpm, durante 16 horas. O cultivo contendo os “fagos de fusão” foi centrifugado a 2000 x g, por 20 minutos, a 10°C. O sobrenadante foi coletado e nele acrescentado de PEG 8000 NaCl. Após 30 minutos no gelo, o sobrenadante foi centrifugado a 3300 x g, por 1 hora, a 10°C. O sedimento foi ressuspensionado em 50 mL de TBS e centrifugado a 15000 x g, por 5 minutos a 10°C. O sobrenadante contendo os fagos de fusão foi coletado, transferido para um novo tubo e armazenado a 4°C, para ser utilizado posteriormente nos ensaios de ligação a BBMV de *T. l. licus*.

6.13.2. Expressão dos genes parental e variantes em *E. coli*

XL-1 Blue

Os genes *cryIIa12* parental e variantes selecionados por *Phage display* e com o tamanho esperado do inserto (1944 pb), indicado pelas PCRs de colônia, foram utilizados para expressão em *E. coli* após indução por IPTG. As colônias selecionadas foram inoculadas em meio SB contendo carbenicilina [100 mg/mL] e incubadas a 37°C, sob agitação de 200 rpm até atingir a de $DO_{600nm} = 0,5$. A expressão foi induzida pela adição de IPTG (concentração final de 2 mM) utilizando agitação de 300 rpm por 16 horas a 37°C. Para obter as toxinas Cry, a partir do lisado celular, as culturas induzidas foram centrifugadas a 2000 x g por 10 minutos. Os sedimentos foram solubilizados em TBS (2% do volume), e transferidos para tubos de microcentrífugas. As células foram lisadas por congelamento em nitrogênio líquido por 5 minutos seguido por descongelamento em banho-maria a 37°C por 3 minutos, repetindo-se esse procedimento por três vezes. Os restos celulares foram separados por centrifugação a 15000 x g por 15 minutos e o sobrenadante contendo as toxinas Cry expressas, armazenados para utilização nos ensaios de atividade.

6.14. Análise das proteínas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para a análise das proteínas expressas em *E. coli*, foi utilizada eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida a 12% (Laemmli 1970).

As amostras das toxinas CryIIa12 e variantes expressas em bactérias foram quantificadas pelo método de Bradford (Bradford 1976). Com microgramas de cada amostra, após o procedimento de lise celular (item 6.13.2), foram concentradas, solubilizadas em 20 µL de tampão de amostra, aquecidas a 100°C durante 10 minutos e aplicadas em SDS-PAGE 12%. A eletroforese foi realizada no sistema Mini

PROTEAN[®] 3 Cell Electroforesis (Bio-Rad), contendo 400 mL de tampão de corrida 1X (190 mM Glicina, 25 mM Tris-Base, 0,1% SDS), aplicando-se uma corrente de 15 mA, durante 90 minutos.

Ao final da eletroforese, o gel foi corado em solução corante de Coomassie Brilliant Blue 1% (p/v) e as bandas foram visualizadas após tratamento com solução descorante contendo 40% de metanol e 12% de ácido acético glacial em água.

6.15. Imunodeteção (Western Blot)

O anticorpo monoclonal Anti-His (Invitrogen[®]) foi utilizado para a detecção das proteínas CryIIa12 expressas em *E. coli*. Para o ensaio de imunodeteção, 100 µg das proteínas expressas em bactérias foram aplicados em gel de poliacrilamida 12,5% (Laemmli 1970). As proteínas separadas na eletroforese foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose Hybond[™]-C Extra (Amersham Biosciences), utilizando-se o equipamento Trans-Blot[®] SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad). A membrana estava equilibrada em tampão de transferência 1X, e a transferência ocorreu a 15 V, por 50 minutos.

A membrana contendo as proteínas foi rapidamente rinsada com tampão TBS 1X e, em seguida, foi incubada na solução de bloqueio 3% (BSA 3% em tampão TBS 1X) durante 2 horas, em temperatura ambiente. A solução de bloqueio foi removida, a membrana lavada com tampão TBS 1X e incubada na solução de bloqueio 1% contendo o anticorpo Anti-His conjugado com fosfatase alcalina 1:2000, durante 4 horas em temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi lavada três vezes com tampão TBS 1X contendo 0,05% de Tween 20 e para revelação utilizou-se o Kit contendo o substrato conjugado com a fosfatase alcalina (Bio-Rad) e seguindo as instruções do fabricante.

6.16. Ensaio de Ligação (ELISA)

Com os produtos das expressões em fagos dos genes *cry* selvagem e variantes, foi realizado um ensaio de ligação dos mesmos às BBMV's de *T. l. licus*. O ensaio consistiu das seguintes etapas: (i) sensibilização de poços de uma placa de microtitulação (96 poços) com 100 µg de BBMV's de *T. l. licus* diluídas em tampão TBS, incubando por 16 horas a 4°C, (ii) saturação de sítios inespecíficos com incubação de 200 µL de solução 3% BSA (em tampão TBS) por 2 horas em temperatura ambiente, (iii) incubação dos poços com as toxinas Cry expressas em fagos (concentrações 0,1,

1,0, 10,0 e 50,0 µg diluídas em TBS) por 4 horas a 37°C, (iv) três lavagens com adição de 100 µL de tampão TBS contendo 0,05% Tween 20, (v) incubação com 100 µL do anticorpo primário monoclonal anti-M13 (diluição 1:2000), por 2 horas em temperatura ambiente; este anticorpo reage especificamente com a capa protéica do produto do gene VIII do fago VCSM13, (vi) três lavagens com 100 µL de tampão TBS contendo 0,05% Tween 20, (vii) incubação com 100 µL do anticorpo secundário IgG *antimouse* conjugado com fosfatase alcalina produzido em cabra (Sigma® - diluído 1:1000), por 2 horas em temperatura ambiente, (viii) três lavagens com 100 µL de tampão TBS contendo 0,05% Tween 20, (ix) revelação utilizando 200 µL de pNPP 1 mg/mL em tampão dietalonamina 1 M, e leitura a 405 nm, após 15 minutos. Esse experimento foi realizado em triplicata e, a partir desses dados, foi estimada a afinidade de ligação das toxinas Cry às BBMV de *T. l. licus*.

6.17. Sequenciamento dos DNAs

As sequências nucleotídicas das moléculas *cry1Aa* e *cryIIa12* variantes selecionadas a partir da biblioteca combinatória foram determinadas em sequenciador automático 3130xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems), localizado na Plataforma de Sequenciamento de DNA da EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Para o sequenciamento, foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores 9 e 10 (Tabela 9), contendo sequências que anelam no vetor pCOMB3X. Além dos oligonucleotídeos iniciadores 11-14 (Tabela 9), que anelam no interior dos genes *cry1Aa* e *cryIIa12* variantes. Nestas reações foram utilizados 0,5-1,0 µg de DNA plasmidial, 3,2 pmoles dos oligonucleotídeos iniciadores, num volume final de 6 µL. Os oligonucleotídeos desenhados e utilizados neste trabalho foram previamente analisados pelo programa ‘Oligotech’ (<http://www.oligotech.com/analysis.php>), que informa a temperatura onde metade dos oligonucleotídeos está anelada, *T_m* (*melting temperature*), a ocorrência de *loops* e/ou homodímeros, bem como a energia necessária para romper estas estruturas indesejáveis.

As sequências resultantes foram analisadas pelos programas “BLASTn” e “BLASTx” disponíveis no endereço eletrônico do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>). A análise comparativa das sequências nucleotídicas utilizando os genes variantes para as toxinas Cry1Aa e

Cry11aI2 e os genes parentais foi realizada pelo programa ClustalW, disponível no servidor Expasy (<http://www.expasy.org/>).

Tabela 9. Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores específicos utilizados para as reações de sequenciamento dos genes *cry* variantes

Número do Oligonucleotídeo Iniciador	Oligonucleotídeo Iniciador	Sequência
9	MMB4	5' GCTTCCGGCTCGTATGTTGTGT 3'
10	MMB5	5' CGTCCATTGCATTCTTTAAT 3'
11	VarPhaDisp_Int_FOR	5' CTTTAGCATTATTGTGTTC 3'
12	VarPhaDisp_Int_REV	5' CGCATACCCGTACGACGTTCC 3'
13	VarPhaDisp_Int_FOR_2	5' GAAATCGTAATAACACAAGGG 3'
14	VarPhaDisp_Int_REV_2	5' CCAGCACCATCACCATCACC 3'

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1. Avaliação da atividade entomotóxica de estirpes *Bt* e toxinas Cry sobre larvas de *T. l. licus*

7.1.1. Efeito entomotóxico das estirpes de *Bt* sor. *kurstaki* e *Bt* sor. *tolworthi* sobre larvas de *T. l. licus*

Os bioensaios com cepas de *B. thuringiensis* sor. *kurstaki* e *B. thuringiensis* sor. *tolworthi* contra larvas de *T. l. licus* indicaram que os tratamentos contendo as estirpes S2195 e S1905 apresentaram a maior média da taxa de mortalidade, com $97,22\% \pm 2,78\%$. Já os tratamentos com as estirpes S135 e S62, apresentaram taxas de mortalidades médias de $33,33\% \pm 12,73\%$ e $30,55\% \pm 5,55\%$, respectivamente (Figura 11).

Em Santos e colaboradores (2009), as estirpes de *Bt* sor. *kurstaki* foram identificadas como tóxicas a lepidópteros do gênero *Spodoptera*. Os lepidópteros se constituem na maior ordem de insetos usualmente testados contra holótipos de toxinas Cry. Todavia, foi constatado que 91% das toxinas testadas foram utilizadas contra um número limitado de espécies (10 ou menos) (Frankenhuyzen 2009); o que denota a importância de se testar outras pragas. Até o momento, somente Craveiro e colaboradores (2010) havia testado toxinas Cry contra espécies do gênero *Telchin*, de modo que os resultados aqui apresentados, obtidos com as larvas de *T. l. licus* (lepidóptero) são importantes, haja vista que foi demonstrado que a sorovariedade *kurstaki* tem toxicidade a este inseto-praga.

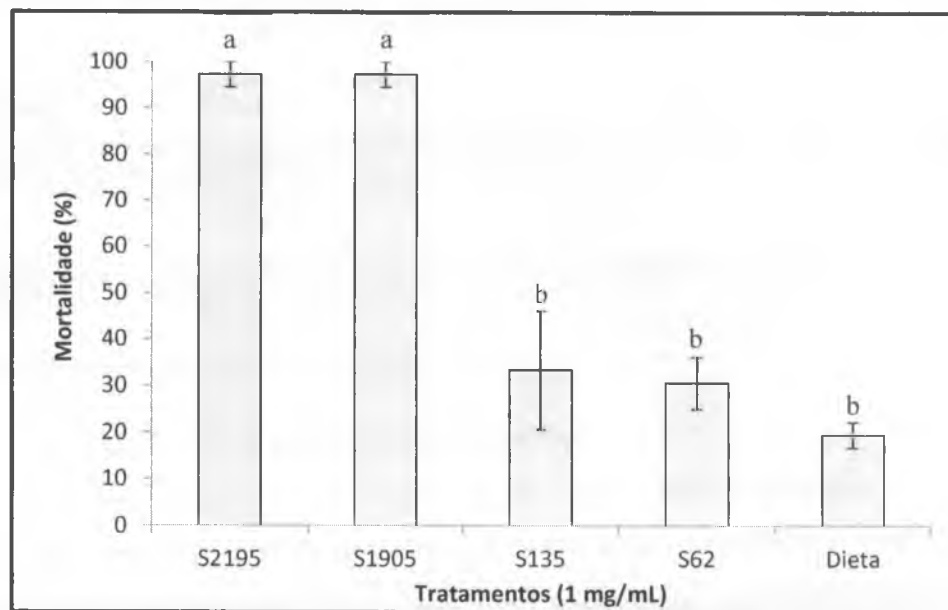


Figura 11. Bioensaios com estirpes de *Bt* de diferentes sorovariedades contra larvas de *T. l. licus*. Letras diferentes são interpretadas como diferenças significativas de acordo com o teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Pela análise dos produtos de PCRs contendo oligonucleotídeos iniciadores específicos para regiões 5' e 3' dos genes *cry1*, *cry2*, *cry3*, *cry4* e *cry9* foram identificados os genes presentes nas estirpes *Bt* sor. *kurstaki* S2195 e S1905 e *Bt* sor. *tolworthi* S135 e S62 (Tabela 10) (Silva-Werneck and Ellar 2008; Santos *et al.* 2009). Além disso, foram obtidos os perfis protéicos das estirpes S1905 e S2195 e identificados dois principais polipeptídeos de aproximadamente 130 e 65 kDa (resultados não mostrados), massas moleculares típicas de toxinas Cry ativas contra insetos lepidópteros, estando em acordo com os resultados encontrados por Santos e colaboradores (2009).

Tabela 10. Genes *cry* presentes nas estirpes de *Bt* sor. *kurstaki* S1905 e S2105 e *Bt* sor. *tolworthi* S135 e S62

Sorovariedade	Estirpes	Genes <i>cry</i>
<i>kurstaki</i>	S1905	<i>cry1Aa</i> , <i>cry1Ab</i> , <i>cry1Ac</i> , <i>cry1B</i> e <i>cry2Aa</i>
	S2195	<i>cry1Ab</i> , <i>cry1E</i> e <i>cry2Aa</i>
<i>tolworthi</i>	S135	<i>cry3B</i> e <i>cry9C</i>
	S62	<i>cry3B</i> e <i>cry9C</i>

7.1.2. Genes *cry* recombinantes

Nos bioensaios com larvas de *T. l. licus*, foram utilizados os genes *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac* e *cry2Aa* isolados, os quais foram identificados por PCRs, utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos previamente descritos (Ceron *et al.* 1994; Ibarra *et al.* 2003) (Figura 12).

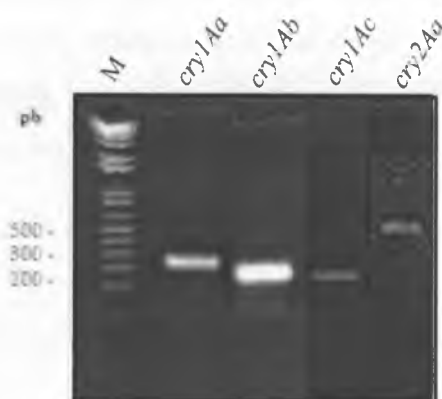


Figura 12. Eletroforese em gel de agarose 1%, mostrando os amplicons referentes aos genes *cry1* e *cry2*. M. Marcador de pesos moleculares – 1 Kb Plus Ladder, amplicons referentes aos genes *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac* e *cry2Aa*, com 246, 216, 180 e 526 pb, respectivamente.

7.1.3. Permeabilidade das BBMV's de *T. l. licus*

Sabendo-se que nas estirpes de *Bt* sor. *kurstaki* S1905 e S2105, estão as toxinas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa e que, em estudos prévios de nosso grupo, foi demonstrado que as toxinas Cry11a12 e Cry8Ka5 têm ação contra insetos lepidópteros e coleópteros, respectivamente (Grossi-de-Sa *et al.* 2007; Oliveira *et al.* 2011), foi testada a capacidade dessas toxinas formarem poros nas BBMV's de *T. l. licus* (Figura 13). Após os tratamentos com as toxinas Cry serem submetidos a um meio hiperosmótico, houve o encolhimento das vesículas e, dependendo de sua permeabilidade ao meio, foi reestabelecida a turgidez das mesmas, podendo as vesículas ser rompidas ou não. Se a toxina Cry testada for específica aos receptores presentes nas

BBMVs, haverá interação toxina-receptor, em seguida a formação de poros e uma consequente ruptura das vesículas, o que será indicado por uma baixa turbidez relativa em relação ao controle hiperosmótico. As toxinas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ia12 e Cry2Aa promoveram a ruptura das BBMVs de *T. l. licus*, demonstrando serem ativas contra esse inseto lepidóptero. Resumidamente, a turbidez relativa é inversamente proporcional à alteração do balanço osmótico ocasionada pelas toxinas Cry nas BBMVs de *T. l. licus*.

Em experimentos com as toxinas Cry1Aa (Kirouac *et al.* 2002; Groulx *et al.* 2011), Cry1Ab (Soberón *et al.* 2000; Munoz-Garay *et al.* 2006) e Cry1Ac (Vanchon *et al.* 2006; Fortier *et al.* 2007), utilizando BBMVs de outro inseto lepidóptero, *Manduca sexta*, evidenciou-se a ação *in vitro* dessas toxinas, estando em acordo com os dados aqui obtidos, mostrando-se ser eficaz para larvas da broca gigante da cana-de-açúcar. Em toxinas Cry, esse tipo de ensaio, denominado dilatação osmótica baseado em espalhamento de luz, tem sido utilizado para estudar o efeito de mutações específicas (Brunet *et al.* 2010), efeitos diferenciais de pH e força iônica (Kirouac *et al.* 2002; Fortier *et al.* 2005), além da influência de inibidores de proteases nas propriedades de formação de poros das toxinas (Kirouac *et al.* 2006).

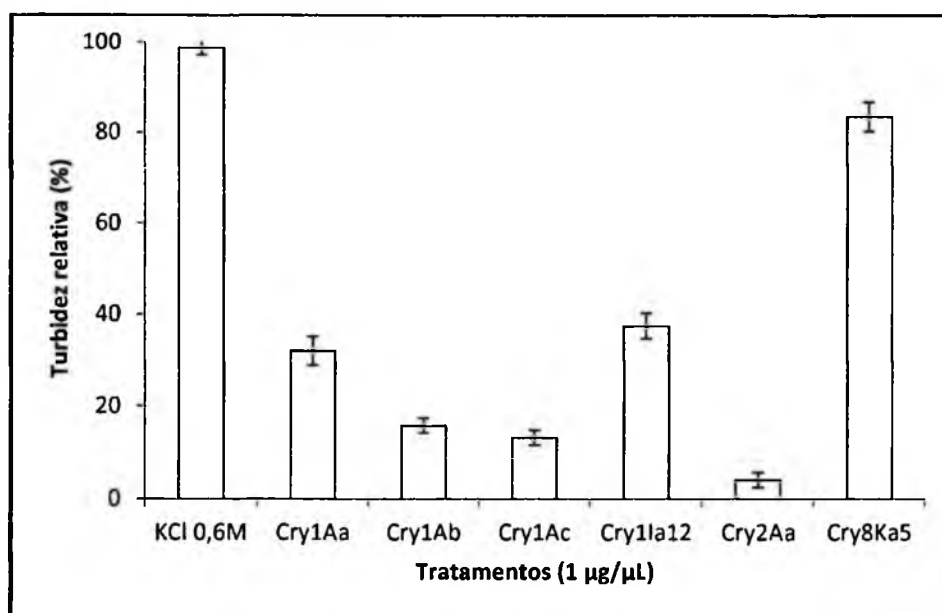


Figura 13. Efeito de toxinas Cry na permeabilidade de BBMVs de *T. l. licus*.

7.1.4. Efeito entomotóxico de toxinas Cry recombinantes sobre larvas de *T. l. licus*

Bioensaios contra larvas de 1º e 2º ínstaes de *T. l. licus* foram realizados e indicaram mortalidade de $91,66\% \pm 4,81\%$, $94,44 \pm 2,78\%$, $90,11\% \pm 5,35\%$ e $91,66\% \pm 4,81\%$ nos tratamentos utilizando as toxinas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa, respectivamente. Enquanto que no tratamento testemunha (somente dieta) obteve-se mortalidade de $19,44\% \pm 2,78\%$, diferindo estatisticamente dos outros tratamentos. No experimento, a toxina Cry8Ka5 foi utilizada como um controle negativo, uma vez que já foi demonstrada a sua ação contra insetos coleópteros (Oliveira *et al.* 2011) (Figura 14). Alguns estudos relataram a atividade de toxinas Cry1 contra outros insetos lepidópteros, tais como *Bombyx mori*, *Pectinophora gossypiella*, *Lymantria dispar*, *Helicoverpa zea* e *Manduca sexta* enquanto que, alguns outros estudos mostraram a atividade das toxinas Cry2 contra dípteros, como *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*, além de lepidópteros (Höfte and Whiteley 1989; Frankenhuyzen 2009).

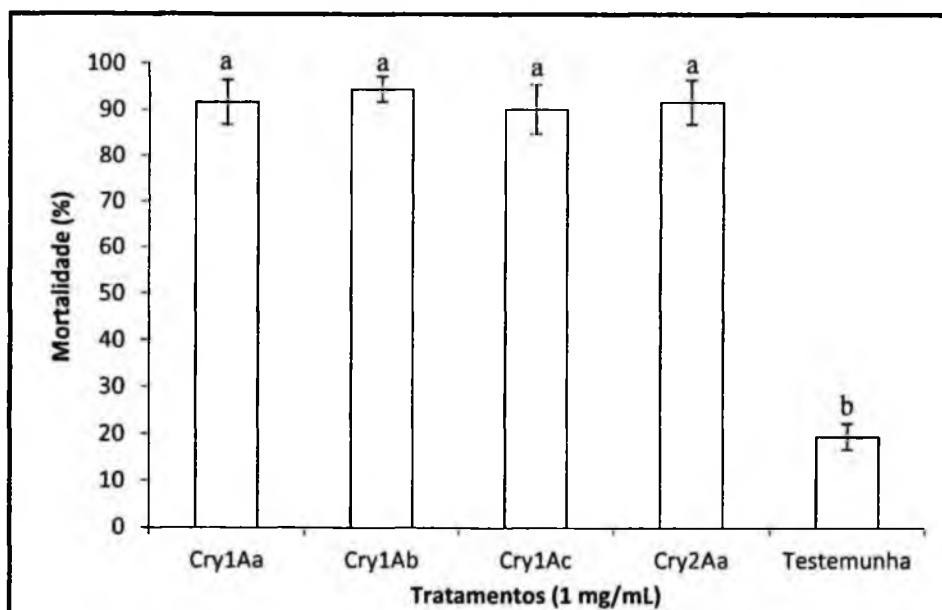


Figura 14. Determinação da taxa de mortalidade das larvas de *T. l. licus* em bioensaios utilizando as toxinas Cry recombinantes. Os tratamentos com as toxinas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa apresentaram diferença estatística significativa em relação ao tratamento testemunha, a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

7.2. Evolução molecular *in vitro* de toxinas Cry

Considerando os resultados dos ensaios de toxicidade com cepas do banco de germoplasma da EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, na disponibilidade

dos genes relacionados, nos resultados prévios sobre a toxicidade para CryIIa12 (Craveiro *et al.* 2010), e o resultado de identidade de sequências entre os genes (Tabela 11), os genes *cryIAa* e *cryIIa12* foram escolhidos para serem recombinados por *DNA shuffling*, tanto em conjunto quanto individualmente. A homologia entre os genes a serem recombinados tem que ser o mais alta possível, uma vez que, utilizando genes muito diferentes entre si, o *DNA shuffling* irá gerar muitos genes variantes não funcionais (Stemmer 1994a; Zhao and Arnold 1997).

Tabela 11. Identidade das sequências nucleotídicas entre os genes *cryIAa*, *cryIIa12* e *cry2Aa*

Genes	Identidade Nucleotídica (%)
<i>cryIAa</i> e <i>cryIIa12</i>	56,2
<i>cryIIa12</i> e <i>cry2Aa</i>	44,5
<i>cryIAa</i> e <i>cry2Aa</i>	42,5
<i>cryIAa</i> , <i>cryIIa12</i> e <i>cry2Aa</i>	26,6

Resultado obtido pelo programa ClustalW, disponível em Expasy <http://www.expasy.org/>.

7.2.1. Amplificação dos genes *cryIAa* e *cryIIa12* contendo os sítios de restrição para as enzimas *Sfi* I, *Bam* HI, *Sph* I e uma sequência âncora

As PCRs utilizando os oligonucleotídeos iniciadores 1-4 (Tabela 7) amplificaram os genes *cryIAa* e *cryIIa12*. A análise dos produtos em gel de agarose (1%) (Figura 15) mostram amplicons equivalentes a massa molecular de aproximadamente 2000 pb (seta), confirmando a integridade dos genes amplificados. Assim, após purificação dos produtos, os DNAs representaram os substratos para a etapa inicial da reação de recombinação por *DNA shuffling*.

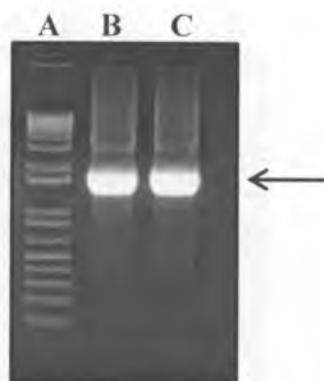


Figura 15. Eletroforese em gel de agarose 1%, mostrando os produtos das PCRs, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores contendo sítios de restrição para as enzimas *Sfi* I, *Bam* HI, *Sph* I e uma sequência de DNA âncora aos genes *cryIAa* e *cryIIa12*. (A) 1 Kb Plus Ladder. Genes (B) amplificação do gene *cryIAa* e (C) amplificação do gene *cryIIa12*.

7.2.2. Fragmentação dos genes *cryIAa* e *cryIIa12*

A digestão dos genes *cryIAa* e *cryIIa12* com DNase I gerou fragmentos de tamanhos variados (Figura 16), os quais foram purificados utilizando colunas Microcon[®] YM-100 (Millipore) (Figura 17), ambos indicados pelos retângulos.

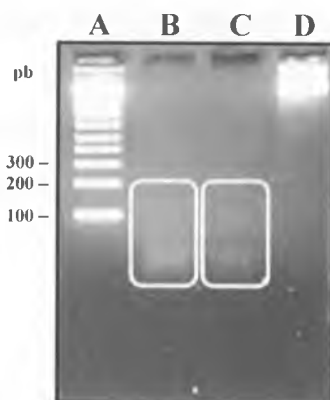


Figura 16. Eletroforese em gel de agarose 2,5%, mostrando o produto da digestão dos genes *cryIAa* e *cryIIa12* com a enzima DNase I (concentração de 30 U/mL). (A) Marcador de massa – 1 Kb Plus Ladder (Invitrogen[®]), (B) produto da fragmentação do gene *cryIAa* e do (C) gene *cryIIa12*, utilizando DNase I, (D) mistura dos genes *cryIAa* e *cryIIa12* não digeridos. A região em destaque se refere aos fragmentos de tamanhos variados (até 125 pb) selecionados para posterior recombinação.

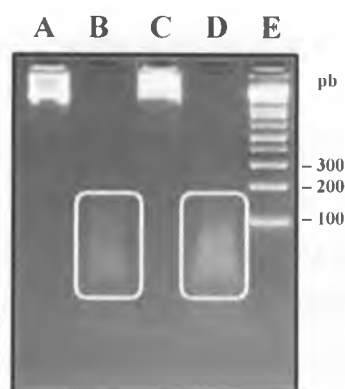


Figura 17. Eletroforese em gel de agarose 2,5%, indicando os fragmentos (até 125 pb) após a purificação utilizando colunas Microcon[®] YM-100 (Millipore). (A) Gene *cryIAa*: não digerido e (B) fragmentos purificados; gene *cryIIa12*: (C) não digerido e (D) fragmentos purificados. (E) Marcador de pesos moleculares – 1 Kb Plus Ladder.

7.2.3. Recombinação dos genes *cryIAa* e *cryIIa12* variantes

Primeiramente, os fragmentos obtidos da digestão dos genes *cryIAa* e *cryIIa12* foram recombinados por PCR sem oligonucleotídeos iniciadores. Na PCR seguinte, foram utilizados 1,5 μ L do produto da primeira PCR como molde e adicionados os oligonucleotídeos iniciadores 5 e 6 (Tabela 7).

Os amplicons obtidos (aproximadamente 2000 pb) (Figura 18) representam as populações de variantes *cryIAa* e *cryIIa12* de aproximadamente 2000 pb. Estes DNAs, posteriormente utilizados para a construção da biblioteca combinatória (*Phage display*) foram obtidos a partir do gel, após purificação.

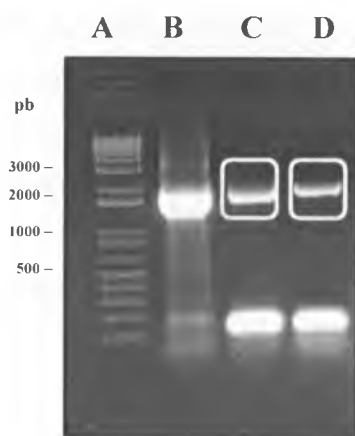


Figura 18. Eletroforese em gel de agarose 0,8%, mostrando o produto da reação do *DNA shuffling* para os genes *cryIAa* e *cryIIa12*. (A) Marcador de pesos moleculares – 1 Kb Plus Ladder, (B) controle positivo, onde o molde tratou-se do DNA utilizado para a digestão com a DNase I (figura 6), (C) genes *cryIAa* e (D) *cryIIa12* recombinados após o *DNA shuffling*.

O fagomídeo pCOMB3X, assim como os genes *cry1Aa* e *cry11a12* parentais e a população dos genes variantes foram digeridos com a enzima *Sfi* I. Em seguida, os genes *cry* foram ligados ao vetor, resultado confirmado PCRs de colônia (resultado não mostrado).

No presente trabalho, foram geradas duas bibliotecas combinatórias, que foram reunidas, após a clonagem no vetor pCOMB3X, apresentando $1,36 \times 10^6$ genes variantes *cry1Aa* e *cry11a12*. Esses genes foram apresentados a superfície de fagos e as proteínas (toxinas Cry) resultantes foram selecionadas por afinidade de ligação aos receptores do intestino médio da broca gigante da cana-de-açúcar. No Laboratório de Interação Molecular Planta-Praga I da EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, toxinas Cry variantes com atividade aumentada têm sido gerados com sucesso por *DNA shuffling*, como é o caso dos variantes do gene *cry11a12synth* e o gene *cry8Ka5* (Craveiro *et al.* 2010; Oliveira *et al.* 2011). O mesmo sucesso não foi obtido por Knight *et al.*, 2004. Estes autores realizaram o *DNA shuffling* utilizando domínios do gene *cry1Ba* e fragmentos de DNA de cinco cepas de *Bt*. No entanto, as quimeras, quando ativas, mostraram entomotoxicidade significativamente mais baixa que os genes parentais. Os autores atribuem este fato a defeitos na conformação protéica ocasionada pela substituição de grandes partes de Cry1Ba pelas partes equivalentes de outras proteínas Cry.

A técnica de *DNA shuffling* introduz mutações pontuais numa taxa relativamente alta: 0,7% (Stemmer 1994a). Dentre os genes *cry* variantes selecionados nesse estudo, a taxa de mutação média também foi 0,7%, indicando êxito na execução do *DNA shuffling*. Apesar de essas mutações proverem diversidade, elas podem ocasionar problemas, especialmente quando essa taxa é muito alta (Zhao and Arnold 1997). No caso da presença de inúmeras mutações, a maioria das proteínas teriam suas funções comprometidas. Enquanto que no caso do número muito baixo de mutações, há a persistência do gene parental, uma baixa diversidade e uma ineficácia do método. Taxas de mutações baixas são requeridas na evolução *in vitro* de genes íntegros (Moore and Arnold 1996).

7.3. Teste de enriquecimento das BBMV de *T. l. licus*

Com o objetivo de analisar a qualidade das BBMV de *T. l. licus* preparadas para utilização em experimentos de ELISA e seleção de variantes Cry por *Phage display*, foram realizados ensaios enzimáticos para determinar o enriquecimento da

atividade específica das enzimas marcadoras de qualidade: fosfatase alcalina (EC 3.1.3.1) e leucina aminopeptidase (EC 3.4.11.1). Os resultados indicaram aumento de 13,5 vezes na atividade da fosfatase alcalina e 7 vezes na atividade da leucina aminopeptidase (Figura 19), demonstrando a qualidade da preparação de BBMV's utilizadas nos experimentos realizadas no presente estudo. Estes resultados estão de acordo com outros estudos que utilizaram BBMV's de insetos lepidópteros. Um incremento de 3 a 22 vezes para a fosfatase alcalina e de 4 a 34 vezes para a leucina aminopeptidase foram obtidos como descrito na literatura (Lorence *et al.* 1997; Bravo *et al.* 2002; González-Cabrera *et al.* 2006; Leonardi *et al.* 2007).

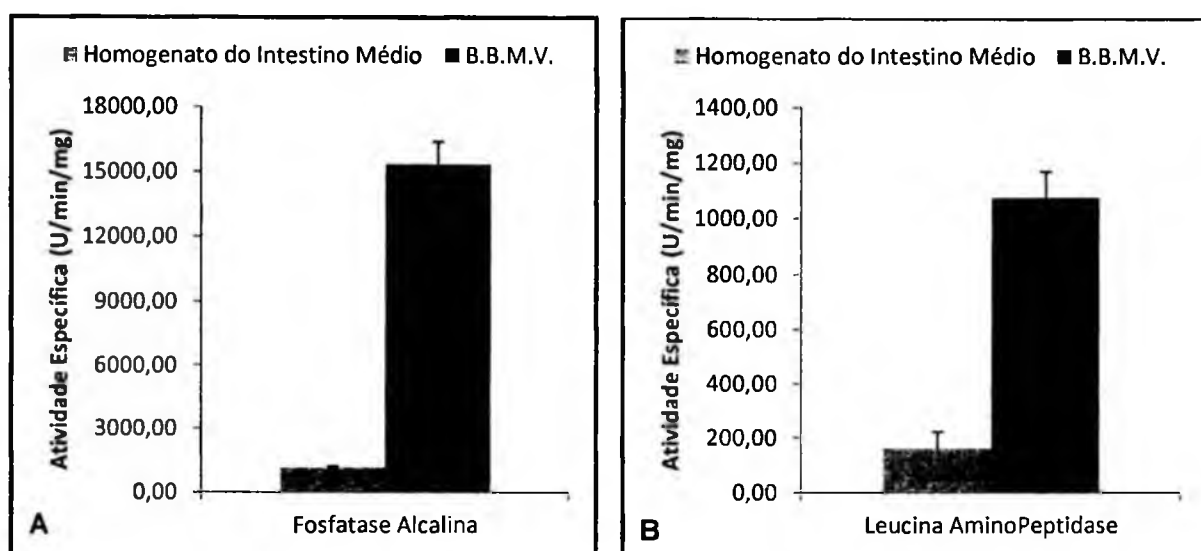


Figura 19. Análise da qualidade das preparações de BBMV's obtidas das larvas de *T. l. licus* pela determinação da atividade específica das enzimas marcadoras (A) fosfatase alcalina e (B) leucina aminopeptidase.

7.4. Seleção das variantes dos genes *cry1Aa* e *cry11a12* por *Phage display*

Partindo da biblioteca combinatória contendo $1,36 \times 10^6$ genes *cry1Aa* e *cry11a12* variantes foram realizados cinco ciclos de seleção (*biopanning*) para selecionar toxinas com atividade para a broca gigante da cana-de-açúcar. Para tanto, os fagos apresentando as proteínas Cry1Aa e Cry11a12 fusionadas à proteína III foram colocados em contato com as BBMV's de *T. l. licus*. Para cada ciclo de seleção (Figura 20), o número de lavagens foi aumentado correspondendo a 8, 15, 25, 30 e 35 lavagens para os ciclos de 1 a 5, respectivamente. Com as lavagens, espera-se que os fagos inespecíficos ou aqueles com fraca afinidade com o alvo sejam eliminados dos poços da placa. Com o aumento da estringência ficam retidos aos poços da placa os fagos

apresentando forte afinidade com o alvo. Após o procedimento de eluição, estes fagos são reamplificados em cada ciclo. O título de entrada ou *input* e o título de saída ou *output* foram determinados para cada ciclo. Os resultados dos títulos de saída obtidos em cada ciclo do *biopanning* estão representados na Figura 22. A análise dos resultados indicou o quarto ciclo como o ciclo de enriquecimento de fagos específicos às BBMV's de *T. l. licus*.

Existem relatos de outros autores sobre tentativas de apresentar toxinas Cry na superfície de fagos filamentosos de uma forma funcional, sendo capazes de ligar-se *in vitro* aos seus receptores naturais, mas sem sucesso (Marzari *et al.* 1997; Kasman *et al.* 1998). No presente estudo, os resultados indicaram que as toxinas Cry1Aa e Cry1Ia12 variantes apresentadas na superfície de fagos VCSM13 mantiveram a capacidade de ligação aos seus receptores, indicando que provavelmente a estrutura das moléculas foi preservada durante a montagem na superfície dos fagos. O mesmo relato é extensivamente discutido nos estudos utilizando as toxinas Cry1Ia12synth e Cry8Ka5 (Craveiro *et al.* 2010; Oliveira *et al.* 2011). Neste contexto, utilizando o sistema de fago T7, variantes da toxina Cry1Aa foram selecionadas por *biopanning*, apresentaram alterações no *loop 2* do domínio II e se ligaram a caderina de *Bombyx mori* com maior afinidade (Ishikawa *et al.* 2007). Também foi mostrado que a toxina Cry1Ac1 foi ativa após ser apresentada na superfície do fago λ (Vilchez *et al.* 2004), reforçando a idéia que é necessária a análise caso a caso para se escolher o sistema de expressão a ser utilizado.

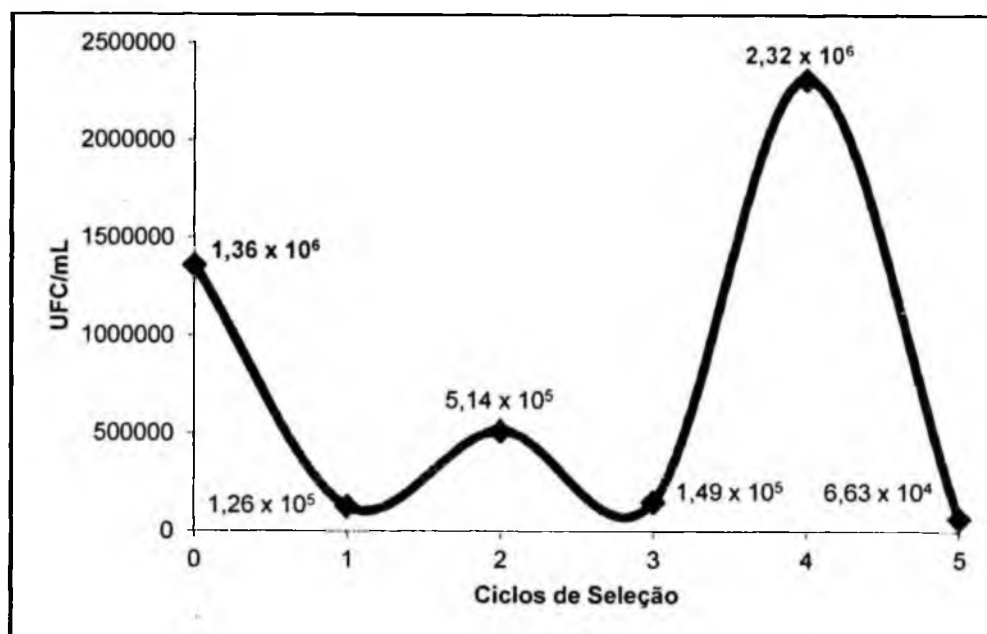


Figura 20. Número de colônias obtidas em cada ciclo de seleção (*biopanning*). Está destacada em verde, a biblioteca combinatória de genes *cry* utilizada neste experimento. A cor vermelha representa o ciclo com maior titulação, sugerindo ser o ciclo de seleção contendo fagos apresentando forte especificidade de ligação às BBMV de *T. l. licus*.

7.5. PCRs de colônia

Partindo dos fagos eluídos no quarto ciclo de seleção, o material de quatrocentas colônias isoladas e escolhidas aleatoriamente foram analisadas por PCRs de colônia. As massas dos amplicons foram consideradas como indicativo de integridade do gene variante em comparação com a massa dos genes parentais *cryIAa* e *cryIIa12* (Figura 21). De quatrocentas colônias analisadas, cinco apresentaram o tamanho aproximado de 1944 pb, indicado pela massa dos genes *cry* parentais.

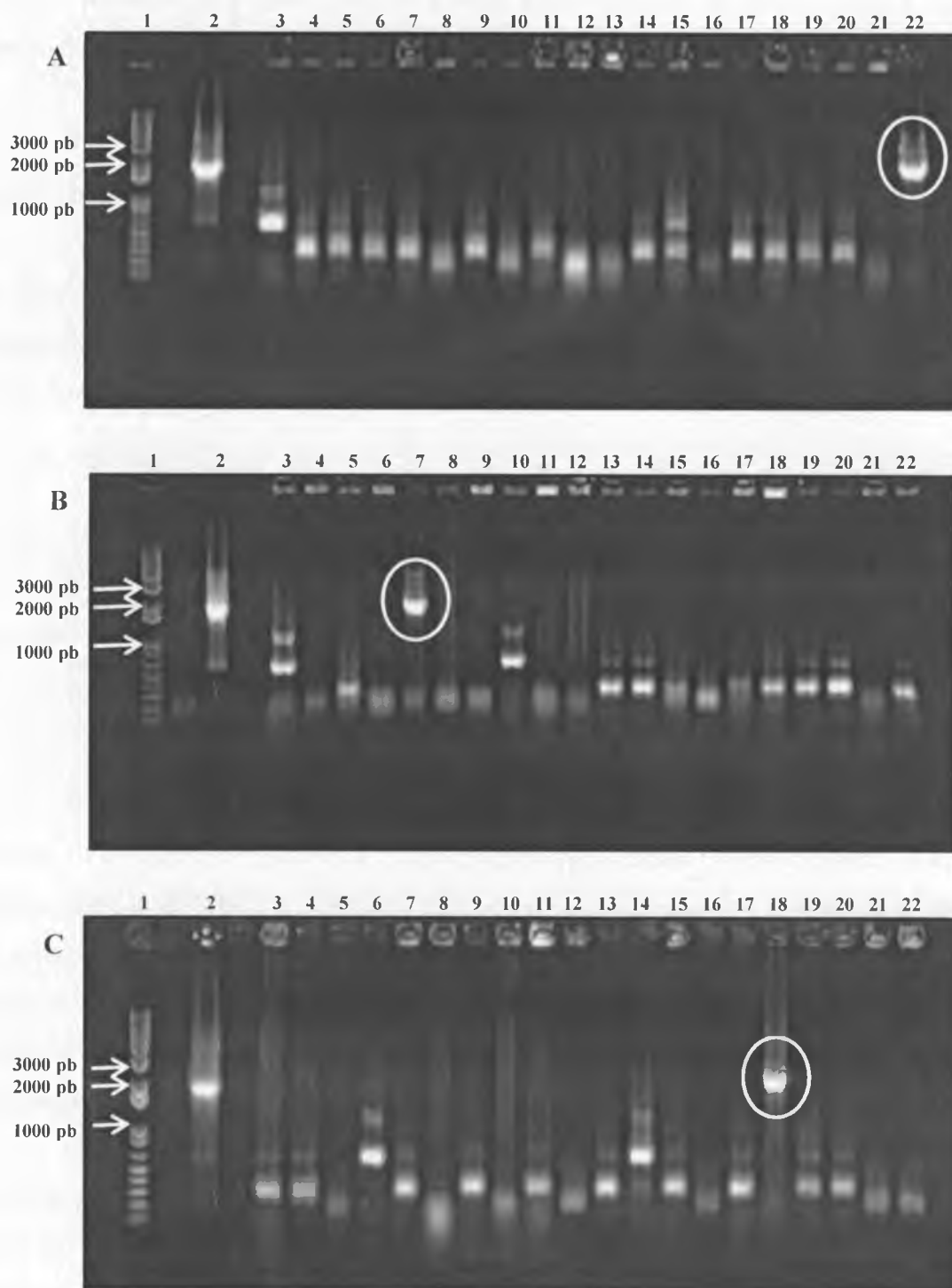


Figura 21. Análise em gel de agarose (0,8%) mostrando o tamanho esperado do inserto (1944 pb) após PCR de colônia. (1) 1 Kb Plus DNA Ladder, (2) Controle positivo (gene *cryIIa12* selvagem), (3-22) Colônias analisadas, onde os círculos indicam amplicons do tamanho equivalente aos genes *cry* parentais (aproximadamente 1944 pb).

Após a seleção das variantes de genes *cryIAa* e *cryIIa12* por PCRs de colônia, foram realizadas reações de sequenciamentos utilizando os oligonucleotídeos iniciadores 9 e 10 (Tabela 9), que anelam nas extremidades desses genes. Com isso, foi constatado, após alinhamentos com as sequências nucleotídicas dos genes *cryIAa* e

cryIIa12 parentais, que esses genes *cry* eram todos variantes do gene *cryIIa12*, cujo número de acesso no Genbank é AY788868.

7.6. Expressão das variantes dos genes *cryIIa12* selvagem e variantes em *E. coli* e imunodeteccção por Western Blot

A expressão das cinco variantes Cry, obtidas nesse estudo, realizada em *E. coli* foi detectada por Western Blot (Figura 22). O sinal detectado em cada variante foi comparado com o sinal dos controles positivo (toxina Cry8Ka5) e negativo (*E. coli* XL-1 Blue não-transformada).

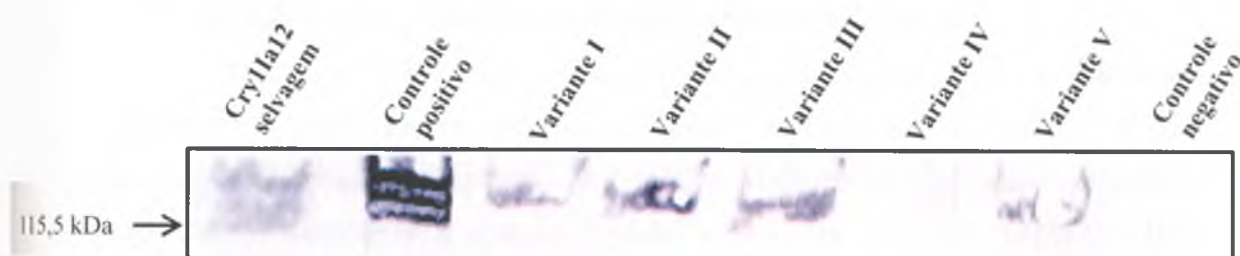


Figura 22. Análise da imunodeteccção por Western Blotting do produto das expressões das toxinas CryIIa12 selvagem e variantes.

O tamanho calculado para as proteínas CryIIa12 e variantes fusionadas a proteína III do fago é de 116,5 kDa. Considerando que a toxina CryIIa12 possui 74 kDa (Grossi-de-Sa *et al.* 2007) e a proteína III, que faz parte da maquinaria protéica do fago M13, possui 42,5 kDa (Barbas III *et al.* 2001). Pela análise comparativa de massa das proteínas detectadas no Western Blot sugere-se que todas as proteínas CryIIa12 parental e variantes selecionadas neste estudo foram corretamente expressas em sistema de expressão utilizando *E. coli*.

Oliveira et al (2011) demonstraram que a toxina Cry8Ka5 foi adequadamente expressa em *E. coli*, após análise em Western Blot utilizando o anticorpo monoclonal Anti-His. Com o anticorpo monoclonal Anti-HA, Craveiro et al (2010) indicou, após a técnica de Dot Blot, que a toxina CryIIa12synth e suas variantes foram expressas a qual foi gerada e selecionada pela combinação das técnicas de *DNA shuffling* e *Phage display*, reiterando o êxito desse sistema.

7.7. Determinação da atividade entomotóxica das variantes CryIIa12 sobre larvas de *T. l. licus*

Para a determinação da atividade entomotóxica das variantes CryIIa12, selecionadas pela afinidade a BBMV's de *T. l. licus* e expressas em *E. coli*, foram realizados bioensaios utilizando as larvas de 1º e 2º instares do inseto alvo. As proteínas expressas foram quantificadas por ELISA, utilizando como padrão a proteína Cry8Ka5 purificada e o anticorpo anti-CryIIa12. A quantificação foi importante para padronizar os tratamentos nos bioensaios adicionando-se a todos os tratamentos a concentração de 3 µg/mL de proteína. Esta concentração foi estabelecida de acordo com o máximo disponível para a variante expressa em menor quantidade (0,05 µg/µL).

Na Figura 23 estão apresentadas as atividades entomotóxicas para as cinco variantes CryIIa12. Foram encontrados índices diferentes de toxicidade para as proteínas testadas. No entanto, as análises estatísticas indicaram diferenças significativas somente entre a toxina Cry2Aa, as variantes II e V e a toxina CryIIa12 selvagem.

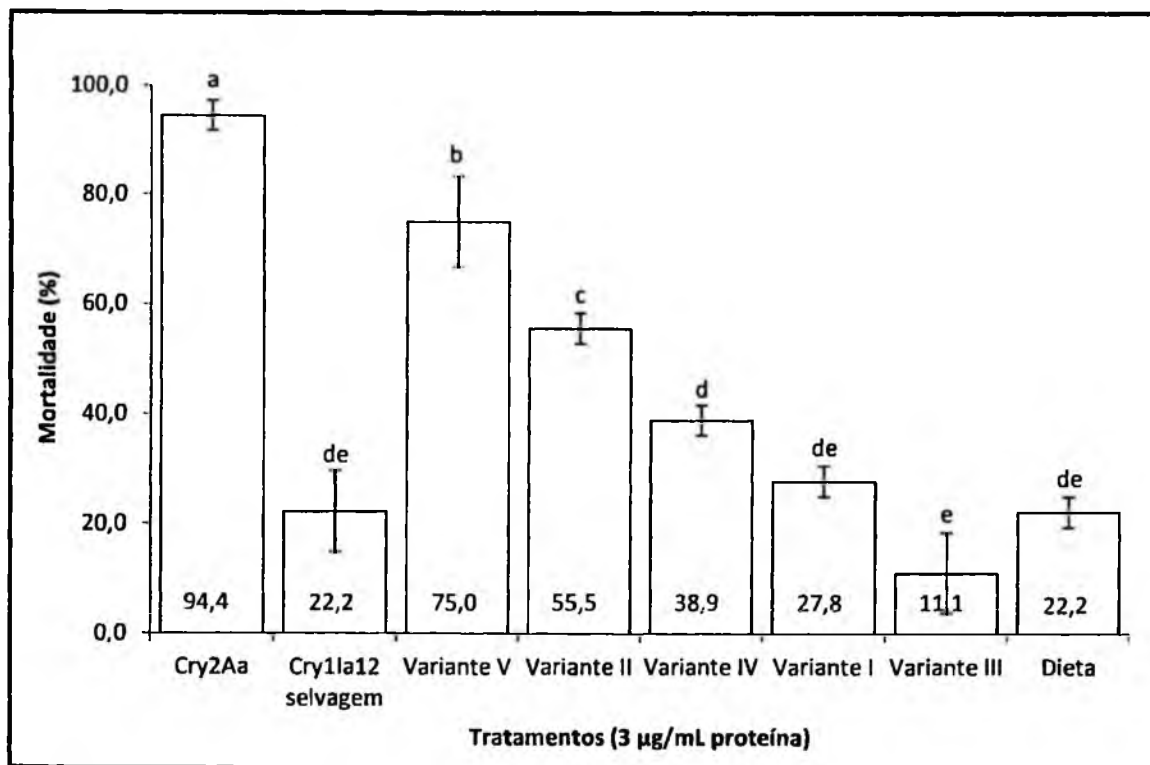


Figura 23. Análise de mortalidade das larvas de *T. l. licus* causadas pelas variantes da toxina CryIIa12 em bioensaios utilizando dieta artificial. Controle negativo, somente dieta líquida artificial, CryIIa12 selvagem, proteína original expressa em *E. coli*, Variantes I, II, III, IV e V, variantes da toxina CryIIa12 expressas em *E. coli*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Duncan no nível de 5% de significância.

Em nosso grupo de pesquisa, em trabalho ainda não publicado, foi desenvolvida uma metodologia para validação de um método de bioensaios utilizando larvas de *T. l. licus*. No presente estudo, essa metodologia foi utilizada e foram identificadas toxinas CryIIa12 variantes com atividades tóxicas promissoras contra a broca gigante da cana-de-açúcar. A aplicação de toxinas Cry ativas contra insetos lepidópteros são bem conhecidas (Antonino-Souza Júnior *et al.* 2009; Baig *et al.* 2010; Valicente *et al.* 2010; Shan *et al.* 2011), porém, há somente um relato, anterior a este estudo, indicando a ação de moléculas variantes de Cry, com atividade contra *T. l. licus* (Craveiro *et al.* 2010).

Os resultados apresentados mostram que a toxina Cry2Aa apresentou a maior atividade para *T. l. licus* dentre as outras variantes testadas. A mesma encontra-se protegida sob a forma de patente (Abad *et al.* 2009), porém a atividade contra a broca gigante da cana-de-açúcar não tinha sido descrita na literatura e, portanto, para fins de aplicação biotecnológica, será alvo de patenteamento. As moléculas variantes de Cry geradas neste estudo após completa validação passarão pelo mesmo processo e serão utilizadas em programa de transformação genética de cana-de-açúcar pela EMBRAPA.

7.8. Ensaio de ligação da toxina CryIIa12 selvagem e suas variantes às BBMV's de *T. l. licus*

A afinidade de ligação das toxinas CryIIa12 e de suas variantes obtidas por evolução molecular *in vitro* às BBMV's de *T. l. licus* foi testada utilizando concentrações crescentes das moléculas Cry (Figura 24). Na concentração ótima de 1 µg, as toxinas variantes II, III e V mostraram maior capacidade de ligação às BBMV's da broca gigante da cana-de-açúcar.

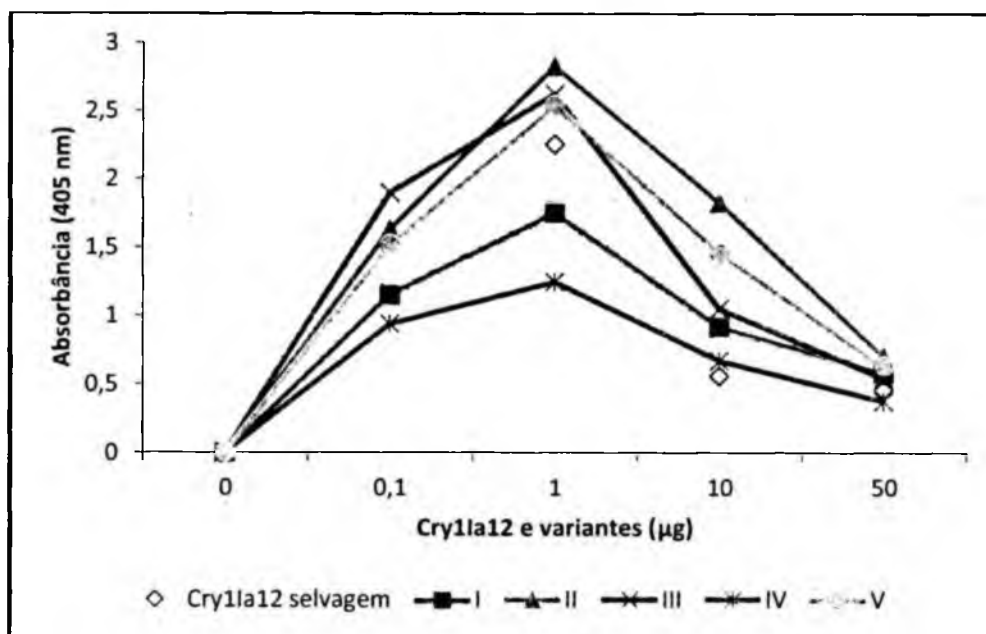


Figura 24. Especificidade de ligação das toxinas CryIIa12 selvagem e variantes às BBMVs de *T. l. licus*.

Comparando-se a atividade entomotóxica das variantes CryIIa12 e selvagem com a especificidade de ligação às BBMVs de *T. l. licus*, é visto que há uma correlação positiva no caso das variantes II e V, onde houve uma maior afinidade de ligação e uma maior capacidade de formar poros nas BBMVs e, conseqüentemente, uma maior ação entomotóxica. No caso da variante III, uma capacidade de ligação às BBMVs não significou uma capacidade de formar poros e, conseqüentemente, mortalidade da variante CryIIa12 sobre as larvas de *T. l. licus*, sugerindo que a mutação causada durante o *DNA shuffling* (S84G) tem influência nesse processo.

7.9. Análise de seqüências das variantes *cryIIa12* selecionadas

No presente estudo, foram obtidas seqüências de genes variantes selecionados da biblioteca combinatória contendo genes *cryIAa* e *cryIIa12* variantes. Os alinhamentos com as seqüências de aminoácidos mostraram alta homologia com seqüência da toxina CryIIa12, indicando que as novas moléculas selecionadas são variantes de CryIIa12. A análise comparativa das seqüências indicou que a recombinação gênica resultou em algumas substituições, deleções ou adições de aminoácidos em comparação à toxina selvagem.

A variante I possui substituição de uma serina (S) por uma glicina (G) na posição 84 e substituição de uma arginina (R) por uma lisina (K) na posição 159, ambas localizadas no domínio I. Além destas, existe uma substituição da glicina G380 por uma

arginina (R), localizada no domínio II. Na variante II, foram identificadas as seguintes alterações: domínio I: substituição de uma serina (S) por uma glicina (G) na posição 84; de uma arginina (R) por uma lisina (K) na posição 159, a deleção dos resíduos de leucina (L) e serina (S) nas posições 212 e 213, e domínio II: substituição de uma glutamina (Q) por uma serina (S) na posição 413, de uma prolina (P) por uma treonina (T) na posição 414 e de uma prolina (P) por uma leucina (L) na posição 419. A variante III possui apenas uma substituição de uma serina (S) por uma glicina (G) na posição 84, localizada no domínio I. A variante IV possui além da substituição de uma serina (S84) por uma glicina (G), a substituição de uma arginina R159 por uma lisina (K), ambas localizadas no domínio I. No domínio II, ocorreu a substituição de uma glicina (G) por uma arginina (R) na posição 380 e a inserção de uma lisina (K) na posição 427. Finalmente, para a variante V, foi identificada apenas uma substituição no domínio I: ácido aspártico (D233) por asparagina (N) (Tabela 12).

Tabela 12. Mutações encontradas nas toxinas CryIIa12 variantes

Variantes CryIIa12	Mutações	Domínio
I	S84G	I
	R159K	I
	G380R	II
II	S84G	I
	R159K	I
	L212del	I
	S213del	I
	Q413S	II
	P414T	II
	P419L	II
III	S84G	I
IV	S84G	I
	R159K	I
	G380R	II
	K426_F427insK	II
V	D233N*	I

*Craveiro et al (2010).

Após a comparação entre os modelos das estruturas das toxinas Cry8Ea1, Cry1Aa, Cry1Ia12synth (Liu and Dean 2006; Guo *et al.* 2009; Craveiro *et al.* 2010) e as variantes Cry1Ia12 obtidas neste estudo, foi possível situar espacialmente a posição das 10 mutações encontradas nas cinco toxinas variantes. Cinco mutações estão localizadas no domínio I, S84G na hélice α -2, R159K na hélice α -4, as deleções dos resíduos de leucina (L) e serina (S) nas posições 212 e 213 no *loop* entre as hélices α -5 e α -6, D233N, na hélice α -6. Já as mutações localizadas no domínio II, são G380R, na folha β -5, Q413S, P414T e P419L, na folha β -8 e a inserção do resíduo de lisina (K) na posição 427, encontra-se no *loop* entre as folhas β -8 e β -9 (Figura 25). Neste estudo, o modelo foi validado com *PSIPRED Protein Structure Prediction Server* (Jones 1999) submetendo as sequências aminoacídicas ao servidor UCL Bloomsbury Centre for Bioinformatics, <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>.

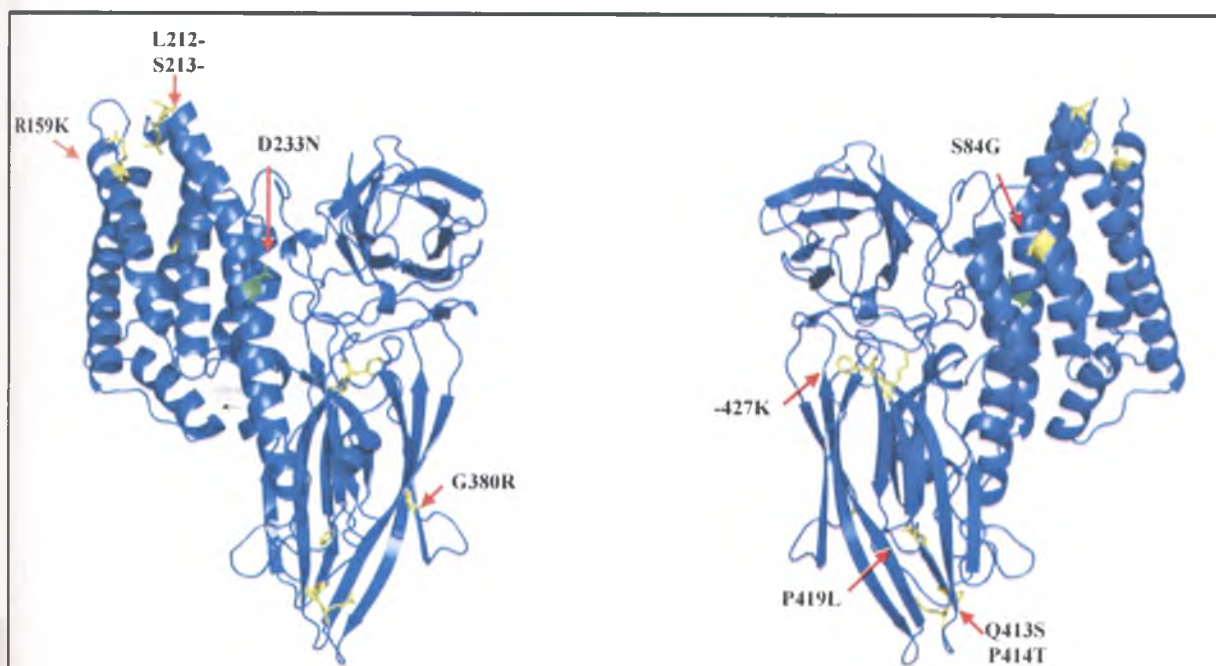


Figura 25. Estrutura tridimensional da toxina Cry1Ia12 e as mutações encontradas nas variantes geradas por *DNA shuffling*.

Analisando os resultados de toxicidade contra larvas de *T. l. licus*, especificidade de ligação às BBMV's e sequenciamento das bases nucleotídicas dos genes *cry1Ia12* variantes, pode-se sugerir que:

(A) a mutação presente na variante III (S84G), localizada no domínio I, o qual é responsável pela inserção na membrana e formação do poro, interfere nesse último

processo, pois é visto que, essa toxina variante, possui capacidade de ligação os receptores do intestino médio (BBMVs), porém não possui atividade tóxica;

(B) A mutação S84G presente também nas variantes I e IV, em conjunto com as mutações R159K e G380R, localizadas no domínio I e II, respectivamente, possivelmente não têm influência na toxicidade contra as larvas de *T. l. licus*. Algo similar acontece na variante IV, com a inserção de uma lisina na posição 427, localizada no domínio II, que é responsável pelo reconhecimento do receptor;

(C) Para a variante II, a qual possui atividade tóxica 2,5 vezes maior que a toxina Cry1Ia12 selvagem, excluindo as mutações S84G e R159K, há, no domínio I, as deleções de uma leucina e um serina, nas posições 212 e 213, respectivamente, e as substituições Q413S, P414T e P419L, no domínio II. Em relação às deleções no domínio I, por se localizarem próximas à hélice α -5, a qual, juntamente com a hélice α -4, é uma região importante na formação de um poro transmembrana estável (Tavecharoenkool *et al.* 2010), pode-se sugerir que pode ter havido um encurtamento do *loop* adjacente, e como uma possível consequência, a formação do poro foi favorecida.

Quanto às substituições do domínio II, considerando que a glutamina e a serina são aminoácidos frequentemente envolvidos em sítios de ligação, a substituição de um pelo outro na posição 413, provavelmente, foi neutra; em relação à substituição de uma prolina, um aminoácido de cadeia lateral não reativa por uma treonina (posição 414), que é um aminoácido muito comum no centro de proteínas funcionais (Betts and Russel 2003), sendo bastante reativo, pode ter facilitado a ação da toxina por prover a flexibilização da estrutura protéica e mais propensa a interagir com o receptor. Novamente a substituição de uma prolina e desta vez com uma leucina (posição 419), um aminoácido também não reativo, porém pode estar envolvido na ligação/reconhecimento de ligantes hidrofóbicos, como as BBMVs, favorecendo o aumento da afinidade da variante Cry1Ia12 aos receptores de *T. l. licus*;

(D) Para a variante V, como discutido em Craveiro *et al.* 2010, a substituição de um ácido aspártico por uma asparagina, na posição 233, torna a toxina menos negativa, afetando as interações da toxina com meio solvente.

Resumindo, as mutações geradas pelo *DNA shuffling* estão localizadas nos domínios I e II das toxinas Cry1Ia12 variantes, tendo relação com a inserção da toxina na membrana e formação do poro, e reconhecimento do receptor pela toxina, respectivamente. A função dessas proteínas inseticidas depende da interação dos três

domínios, os quais possuem diferentes funções relacionadas ao mecanismo de toxicidade e, mesmo pequenas mudanças da estrutura pode ter um efeito sobre a atividade larvicida (Xie *et al.* 2005; Shan *et al.* 2011).

8. CONCLUSÕES

O presente estudo permitiu a identificação de toxinas ativas para o inseto alvo, assim como geração de novas toxinas melhoradas com atividade para larvas de *T. l. licus*.

Genes para essas toxinas têm o potencial de serem aplicados na geração de plantas de cana-de-açúcar resistentes ao inseto-praga estudado e serão alvos de patenteamento.

9. PERSPECTIVAS

Estudos de mutagênese sítio-dirigida e de dinâmica molecular

Para o melhor entendimento do efeito das mutações presentes nas variantes da toxina Cry11a12 sobre a atividade biológica exercida por estas proteínas contra larvas de *T.l.licus*.

Patenteamento dos genes *cry* codificantes para proteínas entomotóxicas e construção de vetores para a transformação genética de cana-de-açúcar

Os genes em questão serão patenteados e serão construídos vetores de expressão com a finalidade de produzir plantas de cana-de-açúcar com resistência a esse inseto-praga.

10. REFERÊNCIAS

- Abad, A. R., H. Dong, S. B. Lo, M. Nelson, X. Shi, C. W. K. Waine and T. Yamamoto (2009) Novel *Bacillus thuringiensis* gene with lepidopteran activity. *Patent Cooperation Treaty*. International, P. H.-B. and Company, D. d. n. (eds.) United States
- Ahmad, A., G. E. Wilde and K. Y. Zhu (2005) Delectability of coleopteran specific Cry3Bb1 protein in soil and its effect on non-target surface and below-ground arthropods. *Environmental Entomology*. **34**, 385-394.
- Almeida, L. C., M. M. Dias Filho and E. B. Arrigoni (2007) First occurrence of *Telchin licus* (Drury, 1773), the "giant sugarcane borer" in the state of São Paulo, Brazil. *Revista de Agricultura (Piracicaba)*. **82**, 223-225.
- An, Y., L. Chen, S. Sun, A. Lv and W. Wu (2011) QuickChange Shuffling: a Convenient and Robust Method for Site-directed Mutagenesis and Random Recombination of Homologous Genes. *New Biotechnology*. **28**.
- Andris-Widhopf, J., C. Rader, P. Steinberger, R. Fuller and C. F. Barbas III (2000) Methods for the generation of chicken monoclonal antibody fragments by phage display. *Journal of Immunological Methods*. **242**, 159-181.
- Antonino-Souza Júnior, J. D., S. Jain, C. M. F. Oliveira, C. F. Ayres and W. A. Lucena (2009) Toxicity of a *Bacillus thuringiensis israelensis*-like strain against *Spodoptera frugiperda*. *BioControl*. **54**, 467-473.
- Arencibia, A., R. I. Vazquez, D. Prieto, P. Tellez, E. R. Carmona, A. Coego, L. Hernandez, G. A. Delariva and G. Selman-Houssein (1997) Transgenic sugarcane plants resistant to stem borer attack. *Molecular Breeding*. **3**, 247-255.
- Bai, Y. Y., R. H. Yan, G. Y. Ye, F. N. Huang and J. A. Cheng (2010) Effects of transgenic rice expressing *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab protein on ground-dwelling collembolan community in postharvest seasons. *Environmental Entomology*. **39**, 243-251.
- Baig, D. N., D. A. Bukhari and A. R. Shakoory (2010) *cry* Genes profiling and the toxicity of isolates of *Bacillus thuringiensis* from soil samples against American bollworm, *Helicoverpa armigera*. *Journal of Applied Microbiology*. **109**, 1967-1978.
- Barbas III, C. F., D. R. Burton, J. K. Scott and G. J. Silverman (2001) *Phage Display: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA
- Bastos, V. D. (2007) Etanol, Alcoolquímica e Biorefinarias, pp 5-38, BNDES Setorial Rio de Janeiro
- Betts, M. J. and R. B. Russel (2003) Amino Acid Properties and Consequences of Substitutions. *Bioinformatics for Geneticists* Barnes, M. R. and Gray, I. C. (eds.), Wiley England
- Betz, F. S., B. G. Hammond and R. L. Fuchs (2000) Safety and Advantages of *Bacillus thuringiensis*-Protected Plants to Control Insect Pests. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. **32**, 156-173.
- BNDES (2008) Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável, pp 316 Rio de Janeiro
- Bobrowski, V. L., L. M. Fiuza, G. Pasquale and M. H. Bodanese-Zanettini (2003) *Bacillus thuringiensis* genes: an approach to confer insect resistance to plants. *Ciência Rural*. **34**, 843-850.

- Boonserm, P., P. Davis, D. J. Ellar and J. Li (2005) Crystal Structure of the Mosquito-larvicidal Toxin Cry4Ba and its Biological Implications. *Journal of Molecular Biology*. **348**, 363.
- Boonserm, P., M. Mo, C. Angsuthanasombat and J. Lescar (2006) Structure of the Functional Form of the Mosquito Larvicidal Cry4Aa Toxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.8-Angstrom Resolution. *Journal of Bacteriology*. **188**, 3391.
- Borém, A., J. A. Silva and V. Diola (2010) Biologia Molecular e Biotecnologia. *Canadá-açúcar: bioenergia, açúcar e álcool - tecnologias e perspectivas*. Santos, F., Borém, A. and Caldas, C. (eds.), pp 333-353, Universidade Federal de Viçosa Viçosa-MG
- Bower, R. and R. G. Birch (1992) Transgenic Sugarcane Plants Via Microprojectile Bombardment. *Plant Journal*. **2**, 409-416.
- Bradford, M. M. (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*. **72**, 248-254.
- Bravo, A., S. S. Gill and M. Soberón (2005) *Bacillus thuringiensis* mechanisms and use. *Comprehensive molecular insect science*. Gilbert, L. I., Iatrou, K. and Gill, S. S. (eds.), pp 175-206, Elsevier
- Bravo, A., I. Gómez, J. Conde, C. Muñoz-Garay, J. Sánchez, R. Miranda, M. Zhuang, S. S. Gill and M. Soberón (2004) Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1667**, 38-46.
- Bravo, A., S. Likitvivatanavong, S. S. Gill and M. Soberón (2011) *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. **41**, 423-431.
- Bravo, A., R. Miranda, I. Gómez and M. Soberón (2002) Pore formation activity of Cry1Ab toxin from *Bacillus thuringiensis* in an improved membrane vesicle preparation from *Manduca sexta* midgut cell microvilli. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1562**, 63-69.
- Bravo, A. and M. Soberón (2008) How to cope with insect resistance to *Bt* toxins? *TRENDS in Biotechnology*. **26**, 573-579.
- Brunet, J. F., V. Vanchon, M. Juteau, J. V. Rie, G. Larouche, C. Vincent, J. L. Schwartz and R. Laprade (2010) Pore-forming properties of the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry9Ca in *Manduca sexta* brush border membrane vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1798**, 1111-1118.
- Carlini, C. R. and M. F. Grossi-de-Sa (2002) Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon*. **40**, 1515-1539.
- Ceron, J., L. Covarrubias, R. Quintero, A. Ortiz, M. Ortiz, E. Aranda, L. Lina and A. Bravo (1994) PCR Analysis of the *cryI* Insecticidal Crystal Family Genes from *Bacillus thuringiensis*. *Applied and Environmental Microbiology*. **60**, 353-356.
- Cesareni, G. (1992) Peptide display on filamentous phage capsids: A new powerful tool to study protein-ligand interaction. *FEBS Letters*. **307**, 66-70.
- Chang, C. C., T. T. Chen, B. W. Cox, G. N. Dawes, W. P. C. Stemmer, J. Punnonen and P. A. Patten (1999) Evolution of a cytokine using DNA family shuffling. *Nature Biotechnology*. **17**, 793-797.
- Christou, P., T. Capell, A. Kohli, J. A. Gatehouse and A. M. R. Gatehouse (2006) Recent developments and future prospects in insect pest control in transgenic crops. *TRENDS in Plant Science*. **11**, 302-308.

- CONAB (2011) http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_01_06_09_14_50_bol_etim_cana_3o_lev_safra_2010_2011..pdf
- Craveiro, K. I. C., J. E. Gomes Júnior, M. C. M. Silva, L. L. P. Macedo, W. A. Lucena, M. S. Silva, J. D. Antonino-Souza Júnior, G. R. Oliveira, M. T. Q. Magalhães, A. D. Santiago and M. F. Grossi-de-Sa (2010) Variant CryIIa toxins generated by DNA Shuffling are active against sugarcane giant borer. *Journal of Biotechnology*. **145**, 215-221.
- Crickmore, N. (2012) http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/toxins2.html
- Crickmore, N. and D. J. Ellar (1992) Involvement of a possible chaperonin in the efficient expression of a cloned CryIIA δ -endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*. *Molecular Microbiology*. **6**, 1533-1537.
- CTNBio (2011) <http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/12482.html>
- CTNBio (2012) <http://www.cib.org.br/ctnbio.php>
- Dal-Bianco, M., M. S. Carneiro, M. S. Hotta, R. C. Chapola, H. P. Hoffmann, A. A. F. Garcia and G. M. Souza (2011) Sugarcane improvement: how far can we go? *Current Opinion in Biotechnology*. **23**, 1-6.
- Daniels, J. and B. T. Roach (1987) Taxonomy and evolution. *Sugarcane improvement through breeding*. Heinz, D. J. (ed.), pp 7-84, Elsevier Amsterdam
- de Maagd, R. A., A. Bravo and N. Crickmore (2001) How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *TRENDS in Genetics*. **17**, 193-199.
- Dean, D. H., F. Rajamohan, M. K. Lee, S.-J. Wu, X. J. Chen, E. Alcantara and S. R. Hussain (1996) Probing the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins site-directed mutagenesis - a minireview. *Gene*. **179**, 111-117.
- Derbyshire, D. J., D. J. Ellar and J. Li (2001) Crystallization of the *Bacillus thuringiensis* toxin CryIAC and its complex with the receptor ligand *N*-acetyl-D-galactosamine. *Acta Crystallographica Section D*. **57**, 1938-1944.
- Diola, V. and F. Santos (2010) Fisiologia. *Cana-de-açúcar: bioenergia, açúcar e álcool - tecnologia e perspectivas*. Santos, F., Borém, A. and Caldas, C. (eds.), pp 25-49, Universidade Federal de Viçosa Viçosa, MG
- Enríquez, G. A., L. E. Trujillo, C. Menéndez, R. I. Vazquez, K. Tiel, F. Dafnis, J. Arrieta, G. Selman and L. Hernandez (2000) Sugarcane (*Saccharum hybrid*) genetic transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*: Production of transgenic plants expressing proteins with agronomic and industrial value. *Developments in Plant Genetics and Breeding*. **5**, 76-81.
- Estruch, J. J., G. W. Warren, M. A. Mullins, G. J. Nye, J. A. Craig and M. G. Koziel (1996) Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*. **93**, 5389-5394.
- Fan, Y., W. Fang, Y. Xiao, X. Yang, Y. Zhang, M. J. Bidochka and Y. Pei (2007) Directed evolution for increased chitinase activity. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **76**, 135-139.
- Feitelson, J. S., J. Payne and L. Kim (1992) *Bacillus thuringiensis*: Insects and Beyond. *Nature Biotechnology*. **10**, 271-275.
- Fernández, L. E., I. Gómez, S. Pacheco, I. Arenas, S. S. Gilla, A. Bravo and M. Soberón (2008) Employing phage display to study the mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins. *Peptides*. **29**, 324-329.

- Fortier, M., V. Vanchon, M. Kirouac, J. L. Schwartz and R. Laprade (2005) Differential Effects of Ionic Strength, Divalent Cations and pH on the Pore-forming Activity of *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Toxins. *The Journal of Membrane Biology*. **208**, 77-87.
- Fortier, M., V. Vanchon, L. Marceau, J. L. Schwartz and R. Laprade (2007) Kinetics of pore formation by the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1768**, 1291-1298.
- Frankenhuyzen, K. v. (2009) Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *Journal of Invertebrate Pathology*. **101**, 1-16.
- Galitsky, N., V. Cody, A. Wojtczak, D. Ghosh, J. R. Luft, W. Pangborn and L. English (2001) Structure of the insecticidal bacterial delta-endotoxin Cry3Bb1 of *Bacillus thuringiensis*. *Acta Crystallographica Section D*. **57**, 1101-1109.
- Goldemberg, J. (2007) Ethanol for a Sustainable Energy Future. *Science*. **315**, 808-810.
- González-Cabrera, J., G. P. Farinós, S. Caccia, M. Díaz-Mendoza, P. Castanera, M. G. Leonardi, B. Giordana and J. Ferré (2006) Toxicity and Mode of Action of *Bacillus thuringiensis* Cry Proteins in the Mediterranean Corn Borer, *Sesamia nonagrioides* (Lefebvre). *Applied and Environmental Microbiology*. **72**, 2594-2600.
- Grochulski, P., L. Masson, S. Borisova, M. Puzsai-Carey, J. L. Schwartz, R. Brousseau and M. Cygler (1995) Cry1A(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. *Journal of Molecular Biology*. **254**, 447-464.
- Grossi-de-Sa, M. F., M. T. Q. Magalhães, M. S. Silva, S. M. B. Silva, S. C. Dias, E. Y. T. Nakasu, P. S. F. Brunetta, G. R. Oliveira, O. B. Oliveira Neto, R. S. Oliveira, L. H. B. Soares, M. A. Z. Ayub, H. A. A. Siqueira and E. L. Z. Figueira (2007) Susceptibility of *Anthonomus grandis* (Cotton Boll Weevil) and *Spodoptera frugiperda* (Fall Armyworm) to a CryIIa-type Toxin from a Brazilian *Bacillus thuringiensis* Strain. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. **40**, 773-782.
- Groulx, N., H. McGuire, R. Laprade, J. L. Schwartz and R. Blunck (2011) Single Molecule Fluorescence Study of the *Bacillus thuringiensis* Toxin Cry1Aa Reveals Tetramerization. *The Journal of Biological Chemistry*. **286**, 42274-42282.
- Guo, S., S. Ye, Y. Liu, L. Wei, J. Xue, H. Wu, F. Song, J. Zhang, X. Wu, D. Huang and Z. Rao (2009) Crystal structure of *Bacillus thuringiensis* Cry8Ea1: An insecticidal toxin toxic to underground pests, the larvae of *Holotrichia parallela*. *Journal of Structural Biology*. **168**, 259-266.
- Hartemink, A. E. (2008) Sugarcane for Bioethanol: Soil and Environmental Issues. *Advances in Agronomy*. **99**, 125-182.
- Heckmann, L. H., B. S. Griffiths, S. Caul, J. Thompsom, M. Puzsai-Carey, W. J. Moar, M. N. Andersen and P. H. Korgh (2006) Consequences for *Protaphorura armata* (Collembola: Onychiuridae) following exposure to genetically modified *Bacillus thuringiensis* (Bt) maize and non-Bt maize. *Environmental Pollution*. **142**, 212-216.
- Hernández-Rodríguez, C. S., A. Boets, J. Van Rie and J. Ferré (2009) Screening and identification of *vip* genes in *Bacillus thuringiensis* strains. *Journal of Applied Microbiology*. **107**, 219-225.
- Hoffmann, M. P., F. G. Zalom, L. T. Wilson, J. M. Smilanick, L. D. Malyj, J. Kiser, V. A. Hilder and W. M. Barnes (1992) Field evaluation of transgenic tobacco containing genes encoding *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin or cowpea

- trypsin inhibitor: efficacy against *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology*. **85**, 2516-2522.
- Höfte, H. and H. R. Whiteley (1989) Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiological Reviews*. **53**, 242-255.
- Husz, B. (1930) Field experiments on the application of *Bacillus thuringiensis* against the corn borer. *Int. Corn Borer Invest. Sci. Rep.* **3**, 91-98.
- Ibarra, J. E., M. C. del Rincón, S. Ordúz, D. Noriega, G. Benintende, R. G. Monnerat, L. Regis, C. M. F. Oliveira, H. Lanz, M. H. Rodriguez, J. Sánchez, G. Peña and A. Bravo (2003) Diversity of *Bacillus thuringiensis* Strains from Latin America with Insecticidal Activity against Different Mosquito Species. *Applied and Environmental Microbiology*. **69**, 5269-5274.
- Ingelbrecht, I. L., J. E. Irvine and T. E. Mirkov (1999) Posttranscriptional gene silencing in transgenic sugarcane. Dissection of homology-dependent virus resistance in a monocot that has a complex polyploid genome. *Plant Physiology*. **119**, 1187-1197.
- Internacionais, B. d. I. (2010) Agricultura do Século 21. *USA, e.-j.* (ed.), pp 46, Departamento de Estado dos Estados Unidos Washington, DC
- Ishikawa, H., Y. Hoshino, Y. Motoki, T. Kawahara, M. Kitajima, M. Kitami, A. Watanabe, A. Bravo, M. Soberón, A. Honda, K. Yaoi and R. Sato (2007) A system for the directed evolution of the insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis*. *Molecular Biotechnology*. **36**, 90-101.
- James, C. (2010) *Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2010. ISAAA Brief N° 42*, ISAAA, Ithaca, NY
- James, C. (2011) *Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2011. ISAAA: Brief N° 43*, ISAAA, Ithaca, NY
- Jones, D. T. (1999) Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *Journal of Molecular Biology*. **292**, 195-202.
- Jurat-Fuentes, J. L. and M. J. Adang (2006) Cry toxin mode of action in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*. **92**, 166-171.
- Kasai, M. and K. Nunogaki (1988) Permeability of sarcoplasmic reticulum. *Methods in Enzymology*. **157**, 437-468.
- Kasman, L. M., A. A. Lukowiak, S. F. Garczynski, R. J. McNall, P. Youngman and M. J. Adang (1998) Phage display of a biologically active *Bacillus thuringiensis* toxin. *Applied and Environmental Microbiology*. **64**, 2995-3003.
- Kikuchi, M., K. Ohnishi and S. Harayama (1999) Novel family shuffling methods for the *in vitro* evolution enzymes. *Genes*. **236**, 159-167.
- Kikuchi, M., K. Ohnishi and S. Harayama (2000) An effective family shuffling method using single-stranded DNA. *Gene*. **243**, 133-137.
- Kirouac, M., V. Vanchon, J.-F. Noel, F. Girard, J.-L. Schwartz and R. Laprade (2002) Amino acid and divalent ion permeability of the pores formed by the *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Aa and Cry1Ac in insect midgut brush border membrane vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1561**, 171-179.
- Kirouac, M., V. Vanchon, D. Quievy, J. L. Schwartz and R. Laprade (2006) Protease inhibitors fail to prevent pore formation by the activated *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Aa in insect brush border membrane vesicles. *Applied and Environmental Microbiology*. **72**, 506-515.
- Knight, J. S., A. H. Broadwell, W. N. Grant and C. B. Shoemaker (2004) A Strategy for Shuffling Numerous *Bacillus thuringiensis* Crystal Protein Domains. *Journal of Economic Entomology*. **97**, 1805-1813.

- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. **227**, 680-685.
- Lakshmanan, P., R. J. Geijskes, K. Aitken, C. L. P. Grof, G. D. Bonnet and G. R. Smith (2005) Sugarcane Biotechnology: The challenges and opportunities. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*. **41**, 345-363.
- Lassner, M. and J. Bedbrook (2001) Directed molecular evolution in plant improvement. *Current Opinion in Plant Biology*. **4**, 152-156.
- Leonardi, M. G., S. Caccia, J. González-Cabrera, J. Ferré and B. Giordana (2007) Leucine Transport Is Affected by *Bacillus thuringiensis* Cry1 Toxins in Brush Border Membrane Vesicles from *Ostrinia nubilalis* Hb (Lepidoptera: Pyralidae) and *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae) Midgut. *The Journal of Membrane Biology*. **214**, 157-164.
- Li, J., J. Carroll and D. J. Ellar (1991) Crystal structure of insecticidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature*. **353**, 815-821.
- Liu, B., L. Wang, Q. Zeng, J. Meng, W. J. Hu, X. G. Li, K. X. Zhou, K. Xu, D. D. Liu and Y. P. Zheng (2009) Assessing effects of transgenic Cry1Ac cotton on the earthworm *Eisenia fetida*. *Soil Biology & Biochemistry*. **41**, 1841-1846.
- Liu, X. S. and D. H. Dean (2006) Redesigning *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin into a mosquito toxin. *Protein Engineering, Design and Selection*. **19**, 107-111.
- Lorence, A., A. Darszon and A. Bravo (1997) Aminopeptidase dependent pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin on *Trichoplusia ni* membranes. *FEBS Letters*. **414**, 303-307.
- Lu, Y. H., A. D'Hont, F. Paulet, L. Grivet, M. Arnaud and J. C. Glaszmann (1994) Molecular diversity and genome structure in modern sugarcane varieties. *Euphytica*. **78**, 217-226.
- Lutz, S., M. Ostermeier, G. L. Moore, C. D. Maranas and S. J. Benkovic (2001) Creating multiple-crossover DNA libraries independent of sequence identity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*. **98**, 11248-11253.
- Macedo, N., D. Macedo, M. B. S. Campos, W. R. T. Novaretti and L. C. C. B. Ferraz (2010) Manejo de Pragas e Nematóides. *Cana-de-açúcar: bioenergia, açúcar e álcool - tecnologias e perspectivas*. Santos, F., Borém, A. and Caldas, C. (eds.), pp 119-159, Universidade Federal de Viçosa Viçosa-MG
- MAPA (2011) www.agricultura.gov.br
- Marroquin, L. D., D. Elyassnia, J. S. Griffiths, J. S. Feitelson and R. V. Aroian (2000) *Bacillus thuringiensis* (Bt) toxin susceptibility and isolation of resistance mutants in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. **155**, 1693-1699.
- Marzari, R., P. Edomi, R. K. Bhatnagar, S. Ahmad, A. Selvapandiyam and A. Bradbury (1997) Phage display of a *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin. *FEBS Letters*. **411**, 27-31.
- Matsuoka, S., J. Bressiani, W. Maccheroni and I. Fouto (2010) Bioenergia de Cana. *Cana-de-açúcar: bioenergia, açúcar e álcool - tecnologias e perspectivas*. Santos, F., Borém, A. and Caldas, C. (eds.), pp 487-517, Universidade Federal de Viçosa Viçosa, MG
- Matsuoka, S., J. Ferro and P. Arruda (2009) The Brazilian experience of sugarcane ethanol industry. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*. **45**, 372-381.
- Mendonça, A. F., A. J. A. Viveiros and F. F. Sampaio (1996) A broca gigante da cana-de-açúcar, *Castnia licus* Drury, 1770 (Lep. Castniidae). *Pragas da cana-de-açúcar*, pp 133-167, Insetos, Cia. Maceió

- Miyazaki, K. (2002) Random DNA fragmentation with endonuclease V: application to DNA shuffling. *Nucleic Acids Research*. **30**, e139.
- Moore, J. C. and F. H. Arnold (1996) Directed evolution of a *para*-nitrobenzyl esterase for aqueous-organic solvents. *Nature Biotechnology*. **14**, 458-467.
- Morse, R. J., T. Yamamoto and R. M. Stroud (2001) Structure of Cry2Aa suggests an unexpected receptor binding epitope. *Structure*. **9**, 409-417.
- Munoz-Garay, C., J. Sánchez, A. Darszon, R. A. de Maagd, P. Bakker, M. Soberón and A. Bravo (2006) Permeability Changes of *Manduca sexta* Midgut Brush Border Membranes Induced by Oligomeric Structures of Different Cry Toxins. *The Journal of Membrane Biology*. **212**, 61-68.
- Naimov, S., S. Dukiandjiev and R. A. de Maagd (2003) A hybrid *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin gives resistance against a coleopteran and a lepidopteran pest in transgenic potato. *Plant Biotechnology Journal*. **1**, 51-57.
- Neri, D., H. Petrucci and G. Roncucci (1995) Engineering recombinant antibodies for immunotherapy. *Cell Biophysics*. **27**, 47-61.
- Neylon, C. (2004) Chemical and biochemical strategies for the randomization of protein encoding DNA sequences: library construction methods for directed evolution. *Nucleic Acids Research*. **32**, 1448-1459.
- Nóbrega, J. C. M. and M. C. Dornelas (2006) Biotecnologia e melhoramento da cana-de-açúcar. *Atualização em produção de cana-de-açúcar*. Segato, S. V., Pinto, A. S., Jendiroba, E. and Nóbrega, J. C. M. (eds.), pp 39-56 Piracicaba
- Oliveira, G. R., M. C. M. Silva, W. A. Lucena, E. Y. T. Nakasu, A. A. P. Firmino, M. A. Beneventi, D. S. L. Souza, J. E. Gomes Júnior, J. D. Antonino-Souza Júnior, D. J. Rigden, H. B. Ramos, C. R. Soccol and M. F. Grossi-de-Sa (2011) Improving Cry8Ka5 toxin activity towards the cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*). *BMC Biotechnology*. **11**, 85.
- Pacheco, S., I. Gómez, R. Sato, A. Bravo and M. Soberón (2006) Functional display of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin on T7 phage *Journal of Invertebrate Pathology*. **92**, 45-49.
- Parker, M. W., F. Pattus, A. D. Tucker and D. Tsernoglou (1989) Structure of the membrane-pore-forming fragment of colicin A. *Nature*. **337**, 93-96.
- Paterson, A. H., G. Souza, M. A. Van Sluys, R. Ming and A. D'Hont (2010) Structural genomics and genome sequencing. *Genetics, Genomics and Breeding of Sugarcane*. Henry, R. and Kole, C. (eds.), pp 149-165, Science Publishers Enfield, NH
- Patten, P. A., R. J. Howard and W. P. C. Stemmer (1997) Applications of DNA shuffling to pharmaceuticals and vaccines. *Current Opinion in Biotechnology*. **8**, 724-733.
- Peng, W., H. Levine, T. Hwa and D. A. Kessler (2004) Analytical study of the effect of recombination on evolution via DNA shuffling. *Physical Review E*. **69**, 051911.
- Planalsucar (1977) *Guia das principais pragas da cana-de-açúcar no Brasil*, Piracicaba
- Prasad, E. R., A. Dutta-Gupta and K. Padmasree (2010) Insecticidal potential of Bowman-Birk proteinase inhibitors from red gram (*Cajanus cajan*) and black gram (*Vigna mungo*) against lepidopteran insect pests. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. **98**, 80-88.
- Rukmini, V., C. Y. Reddy and G. Venkateswerlu (2000) *Bacillus thuringiensis* crystal delta-endotoxin: Role of proteases in the conversion of protoxin to toxin. *Biochimie*. **82**, 109-116.
- Santos, K. B., P. Neves, A. M. Meneguim, R. B. D. Santos, W. J. D. Santos, G. V. Boas, V. F. Dumas, E. Martins, L. B. Praça and R. G. Monnerat (2009)

- Selection and characterization of the *Bacillus thuringiensis* strains toxic to *Spodoptera eridania* (Cramer), *Spodoptera cosmioidea* (Walker) and *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Biological Control*. **50**, 157-163.
- Schnepf, H. E., N. Crickmore, J. Van Rie, D. Lereclus, J. R. Baum, J. Feitelson, D. R. Zeigler and D. H. Dean (1998) *Bacillus thuringiensis* and Its Pesticidal Crystal Proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **62**, 775-806.
- Schnepf, H. E., H. C. Wong and H. R. Whiteley (1985) The Amino Acid Sequence of a Crystal Protein from *Bacillus thuringiensis* Deduced from the DNA Base Sequence. *The Journal of Biological Chemistry*. **10**, 6264-6272.
- Shan, S., Y. Zhang, X. Ding, S. Hu, Y. Sun, Z. Yu, S. Liu, Z. Zhu and L. Xia (2011) A Cry1Ac Toxin Variant Generated by Directed Evolution has Enhanced Toxicity against Lepidopteran Insects. *Current Microbiology*. **62**, 358-365.
- SIAMIG (2011) www.siamig1.com.br
- Silva-Werneck, J. O. and D. J. Ellar (2008) Characterization of a novel Cry9Bb δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Invertebrate Pathology*. **98**, 320-328.
- Smith, G. P. (1985) Filamentous fusion phage-novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*. **228**, 1315-1317.
- Smith, G. P. and V. A. Petrenko (1997) Phage display. *Chemical reviews*. **97**, 391-410.
- Soberón, M., R. V. Pérez, M. E. Nunez-Valdéz, A. Lorence, I. Gómez, J. Sánchez and A. Bravo (2000) Evidence for intermolecular interaction as a necessary step for pore-formation activity and toxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *FEMS Microbiology Letters*. **191**, 221-225.
- Souza, G. M. and A. M. Silva (2002) SUCEST: Desvendando as vias de transdução de sinal da cana-de-açúcar. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*. **25**, 58-63.
- Stemmer, W. P. C. (1994a) DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: *in vitro* recombination for molecular evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*. **91**, 10747-10751.
- Stemmer, W. P. C. (1994b) Rapid evolution of a protein *in vitro* by DNA shuffling. *Nature*. **370**, 389-391.
- Sticklen, M. B. (2008) Plant genetic engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol. *Nature Reviews*. **9**, 433-443.
- Stoop, A. A., L. Jaspers, I. Lasters, E. Eldering and H. Pannekoek (2000) High-density mutagenesis by combined DNA shuffling and Phage display to assign essential amino acid residues in protein-protein interactions: application to study structure-function of plasminogen activation inhibitor 1 (PAI-I). *Journal of Molecular Biology*. **301**, 1135-1147.
- Tavecharenkool, T., C. Angsuthanasombat and C. Kantchanawarin (2010) Combined molecular dynamics and continuum solvent studies of the pre-pore Cry4Aa trimer suggest its stability in solution and how it may form a pore. *PMC Biophysics*. **3**, 1-16.
- USDA (2010) Sugar: World Production, Supply and Distribution
- Valencia, A. (2009) As enzimas presentes no trato digestivo dos insetos: um alvo susceptível de inibição. *Biologia Celular*, pp 99, Universidade de Brasília Brasília-DF
- Valicente, F. H., E. A. T. Picoli, M. J. V. Vasconcelos, N. P. Carneiro, A. A. Carneiro, C. T. Guimarães and U. G. Lana (2010) Molecular characterization and distribution of *Bacillus thuringiensis cry1* genes from Brazilian strains effective against the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. *Biological Control*. **53**, 360-366.

- Vanchon, V., J. L. Schwartz and R. Laprade (2006) Influence of the biophysical and biochemical environment on the kinetics of pore formation by Cry toxins. *Journal of Invertebrate Pathology*. **92**, 160-165.
- Vercesi, M. L., P. H. Krogh and M. Holmstrup (2006) Can *Bacillus thuringiensis* (Bt) corn residues and Bt-corn plants affect life-history traits in the earthworm *Aporrectodea caliginosa*? *Applied Soil Ecology*. **32**, 180-187.
- Vílchez, S., J. Jacoby and D. J. Ellar (2004) Display of Biologically Functional Insecticidal Toxin on the Surface of Lambda Phage. *Applied and Environmental Microbiology*. **70**, 6587-6594.
- Walters, F. S., C. M. deFontes, H. Hart, G. W. Warren and J. S. Chen (2010) Lepidopteran-active variable-region sequence imparts coleopteran activity in eCry3.1Ab, an engineered *Bacillus thuringiensis* hybrid insecticidal protein. *Applied and Environmental Microbiology*. **76**, 3082-3088.
- Willats, W. G. T. (2002) Phage display: practicalities and prospects. *Plant Molecular Biology*. **50**, 837-854.
- Wolfersberger, M., P. Luethy, A. Maurer, P. Parenti, F. V. Sacchi, B. Giordana and G. M. Hanozet (1987) 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*. **86**, 301-308.
- Xie, R., M. Zhuang, L. S. Ross, I. Gómez, D. I. Oltean, A. Bravo, M. Soberón and S. S. Gill (2005) Single Amino Acid Mutations in the Cadherin Receptor from *Heliothis virescens* Affect Its Toxin Binding to Cry1Aa Toxins. *The Journal of Biological Chemistry*. **280**, 8416-8425.
- Zhang, X., M. Candas, N. B. Griko, L. Rose-Young and L. A. Bulla Jr. (2005) Cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin depends on specific binding of the toxin to the cadherin receptor BT-R₁ expressed in insect cells. *Cell Death & Differentiation*. **12**, 1407-1416.
- Zhao, H. and F. H. Arnold (1997) Optimization of DNA shuffling for high fidelity recombination. *Nucleic Acids Research*. **25**, 1307-1308.
- Zhao, H., L. Giver, Z. Shao, J. Affholter and F. H. Arnold (1998) Molecular evolution by staggered extension process (StEP) *in vitro* recombination. *Nature Biotechnology*. **16**, 258-261.
- Zhao, J.-Z., J. Cao, H. L. Collins, S. L. Bates, R. T. Roush, E. D. Earle and A. M. Shelton (2005) Concurrent use of transgenic plants expressing a single and two *Bacillus thuringiensis* genes speeds insect adaptation to pyramided plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*. **102**, 8426-8430.
- Zhao, J.-Z., J. Cao, Y. Li, H. L. Collins, R. T. Roush, E. D. Earle and A. M. Shelton (2003) Transgenic plants expressing two *Bacillus thuringiensis* toxins delay insect resistance evolution. *Nature Biotechnology*. **21**, 1493-1497.
- Zhuang, M., D. I. Oltean, I. Gómez, A. K. Pullikuth, M. Soberón, A. Bravo and S. S. Gill (2002) *Heliothis virescens* and *Manduca sexta* lipids rafts are involved in Cry1A toxin binding to the midgut epithelium and subsequent pore formation. *The Journal of Biological Chemistry*. **277**, 13863-13872.

ANEXO I

Os meios de cultura foram autoclavados a 120-130°C por 20 minutos e acondicionados em temperatura ambiente até sua utilização.

Meios de Cultura

MEIO LB	(p/v)
Triptona	1%
Extrato de levedura	0,5%
Cloreto de Sódio	0,5%
pH 7,0	

MEIO LB ÁGAR	(p/v)
Triptona	1%
Extrato de levedura	0,5%
Cloreto de Sódio	0,5%
pH 7,0	
Ágar	1,5%

MEIO SB	(p/v)
MOPS	1%
Extrato de levedura	2%
Triptona	3%
pH 7,0	

ANEXO II

Soluções e Tampões

PEG/NaCl	(p/v)
PoliEtileno Glicol 8000	20%
Cloreto de Sódio	15%

TAMPÃO MET

Manitol	300 mM
EGTA	5 mM
Tris base	17 mM
pH 7,5	
PMSF	1 mM

TAMPÃO DE DNase I

Tris-HCl pH 7,5	50 mM
MnCl ₂	1 mM
BSA	0,1 mg/mL

TAMPÃO TBS

Tris-HCl pH 7,5	50 mM
NaCl	150 mM

TAMPÃO PBS

NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄	12 mM
KH ₂ PO ₄	1,2 mM
pH 7,4	

TAMPÃO TRIS-GLICINA 5X

Tris Base 125 mM

Glicina 960 mM

pH 8,3

TAMPÃO DE TRANSFERÊNCIA

Tampão Tris-Glicina 1X

Metanol 20%

TAMPÃO DE AMOSTRA 2X

Tris-HCl pH 6,8 100 mM

SDS 4 %

Azul de Bromofenol 0,2%

Glicerol 20%

Dithiotreitol 200 mM

ANEXO III

Seleção a partir da placa de ELISA sensibilizada

No dia anterior a placa de ELISA foi sensibilizada com 100 µg de enzima q.s.p. 100 µL de TBS e incubada Overnight a 4°C.

	Horários				
1. Incubar a placa de Elisa a 37°C por 1 hora.					
2. Lavar três vezes com 150 µL de PBS-Tween 0,1% - colocando e descartando por inversão da placa em papel toalha.					
3. Adicionar 150µL de BSA 3% em TBS Incubar a 37°C por 1h. (solução de bloqueio).					
4. Descarte a solução de bloqueio e lave 3x com PBS-T como em (2).					
5. Adicione 100 µL de preparação de fago Incube 2 horas – 37°C.					
6. Lave os fagos invertendo a placa em papel toalha e adicionando 150 µL de PBS-Tween pipentado “up-down” 5-6 vezes e esperando 5 minutos em cada vez. Repetir 5x no primeiro ciclo e ir aumento conforme os resultados.					
7. Adicionar 100 µL de tampão tris-glicina pH 2.2 (Tp. de eluição) Incubar 10 min. Temp. amb.					
8. Pipete 10x “up-down” e transfira para um tubo eppendorf contendo 12µL de tris-base 2M (Tp. neutralizante) (=material de “output” para infectar bactéria)					
9. Transferir 106µL deste “output” para 2 mL de cultura de <i>E. coli</i> competente, com ~1.0 de OD. Incubar 15 minutos em temperatura ambiente.					
10. Adicionar 6 mL de meio SB (pré-aquecido a 37°C) 2% Glicose (ou 320 µL de glicose 50%) 1,6 µL de Carbenicilina (100 mg/mL) 12 µL de Tetraciclina (5 mg/mL)					
11. Retirar 200 µL deste cultivo para plaqueamento de “output”; Incubar o restante a 37C, 300 rpm por 1h.					

12. Adicionar 2,4 µL de Cb (100mg/ml) Incubar por 1h a 37°C, 300 rpm					
13. Sensibilizar placa de ELISA para dia seguinte (1 µg de proteína em 98 µL de TBS – 4°C O.N.)					
14. Adicionar aos 8 mL de cultivo: 91 mL de meio SB pré-aquecido 1 mL de fago VC13(helper) 46 µL de Cb (100mg/ml) 184 µL de Tc (5mg/ml) Incube por 1 ½ - 2 hs a 37°C 300 rpm					
15. Adicione 70 µL de Canamicina (100 mg/mL) Incube a 37°C 300 rpm, durante pelo menos 12 horas.					

Plaqueamento do “Output”:

O material coletado no item 11 pode ser plaqueado em diluições (sem diluição/ $10^{-2}/10^{-4}$ e 10^{-6}).

Partir de 2 µL do cultivo para 198 µL de meio SB (diluição 10^{-2}).

Plaquear 100 µL de cada diluição em placas LB/Agar com 50 µg/mL de carbenicilina.

Ciclos de Seleção – Cultivo e preparação de fagos

	Horários				
1. Do cultivo que ficou incubando O.N. coletar 4 tubos com 1 mL. Centrifugar 6000 rpm por 20 minutos a 4°C Transferir o sobrenadante para tubos novos e guardar 4°C. O precipitado é guardado à -20°C para futura extração de DNA.					
2. Centrifugar o restante do cultivo (4000 rpm (rotor GSA – Sorwal; 4°C por 20 minutos).					
3. Transfira o sobrenadante para frasco novo e adicione 20 mL de PEG 8000/NaCl 5X. Incube no gelo por 30 minutos.					
4. Coloque para crescer a 37°C (250 rpm) 5 uL de <i>E. coli</i> competente em 5 ml de meio SB pré-aquecido. A OD deve se aproximar de 1,0 após 3-4 horas.					
5. Cont. do item 3: Centrifugue 5000 rpm (rotor GSA) por 1 hora a 4°C.					
5. Descarte o sobrenadante e inverte o tubo para escorrer em papel toalha, por 10					

minutos.					
6. Ressuspende o precipitado em 1,0 mL de BSA 1% em TBS, pipetando “up-down”.					
7. Transfira para tubos novos e centrifugue rotação máxima por 5 minutos a 4°C . Guarde o sobrenadante a 4°C e descarte o precipitado.					

ps: Esta preparação deve ser usada para infectar *E. coli* e fazer o plaqueamento.

Caso a seleção não for continuar no dia seguinte deve-se fazer a reamplificação deste material para dar continuidade à seleção.

Plaqueamento de Input:

- 1) Fazer diluições de $10^{-2}/10^{-4}/10^{-6}/10^{-8}/10^{-10}$, partindo de 2 μL da preparação de fago em 198 μL de meio SB.
- 2) 2 μL das diluições a ser plaqueadas (bom é $10^{-6}/10^{-8}$ e 10^{-10}) devem ser adicionados a 200 μL de cultura de *E. coli* (Item 4)
- 3) Incubar 15 minutos a temperatura ambiente.
- 4) Plaquear 100 μL de cada diluição em placas de SB/ágar com 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Carbenicilina, incubar a 37°C Overnight.
- 5) Determinar a titulação e calcular qual a UFC/mL.

Apêndice

– Artigos –



Variant Cry1Ia toxins generated by DNA shuffling are active against sugarcane giant borer

Kilvia I.C. Craveiro^{a,b,c}, José Edilson Gomes Júnior^{a,b}, Maria Cristina M. Silva^a, Leonardo L.P. Macedo^{a,d}, Wagner A. Lucena^{a,e,f}, Marília S. Silva^g, José Dijair Antonino de Souza Júnior^{a,b}, Gustavo R. Oliveira^{a,e,i}, Mariana T. Quezado de Magalhães^{a,e}, Antônio D. Santiago^h, Maria Fatima Grossi-de-Sa^{a,d,*}

^a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, PqEB-Final W5 Norte, CEP 70770-900, Brasília, DF, Brazil

^b Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, CEP 70910-900, Brasília, DF, Brazil

^c Embrapa Transferência de Tecnologia, PqEB-Final Av. W5 Norte, CEP 70770-901, Brasília, DF, Brazil

^d Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, SGAN 916-Av. W5 Norte, CEP 70790-160, Brasília, DF, Brazil

^e Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Campus do Vale, Av. Bento Gonçalves 9500, Prédio 43421, CP 15005, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

^f Embrapa Algodão, Rua Oswaldo Cruz 1143, Centenário, CP 174, Campina Grande, PB, Brazil

^g Embrapa Cerrados, BR 020 Km 18, CP 08223, CEP 73310-970, Planaltina, DF, Brazil

^h Embrapa Tabuleiros Costeiros, Av. Beira Mar 3250, Jardins, CP 44, CEP 49025-040, Aracaju, SE, Brazil

ⁱ Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, Centro Politécnico, Universidade Federal do Paraná, CEP 81531-990, Curitiba, PR, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 August 2009

Received in revised form 3 November 2009

Accepted 12 November 2009

Keywords:

Telchin licus licus

Bacillus thuringiensis

Saccharum officinarum

Brush Border Midgut Vesicles

Phage-display

Molecular modelling

ABSTRACT

Sugarcane giant borer (*Telchin licus licus*) is a serious sugarcane pest in Americas whose endophytic lifestyle hampers effective chemical and biological controls. Therefore, development of alternative control methods is extremely important. Envisaging development of transgenic plants resistant to this pest, we investigated the effect of the *Bacillus thuringiensis* Cry protein Cry1Ia12synth (truncated protein lacking C-terminus with plant codon usage) and variants against *T. l. licus*. *cry1Ia12synth* gene was used to generate mutated variants, which were screened for toxicity toward *T. l. licus*. For that purpose, an innovative technique combining *cry* gene shuffling with phage-display was used to build a combinatorial library comprising 1.97×10^5 Cry1Ia12synth variants. Screening of this library for variants binding to *T. l. licus* Brush Border Midgut Vesicles led to the identification of hundreds of clones, out of which 30 were randomly chosen for toxicity testing. Bioassays revealed four variants exhibiting activity against *T. l. licus* as compared to the non-toxic Cry1Ia12synth. Eight single substitutions sites were found in these active variants. Based on theoretical molecular modelling, the probable implications of these mutations are discussed. Therefore, we have four genes encoding Cry1Ia12synth variants active against *T. l. licus* promising for future development of resistant transgenic sugarcane lines.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Despite technological advances, sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) culture still faces several phytosanitary problems and plant predators. Sugarcane giant borer, *Telchin licus licus* (Drury, 1773) (Lepidoptera: Castniidae), is one of the most important insect pests of the sugarcane crop, occurring in several countries of the Americas (Mendonça et al., 1996). The *T. l. licus* caterpillar develops inside the sugarcane stem, survives from one season to the next and causes significant annual economical losses (Mendonça, 1982). This endophytic lifestyle hampers the effectiveness of chemical,

mechanical and biological control methods. The damage caused by this insect pest involves destruction of the basal internodes, reduction of sucrose, and formation of galleries that may compromise the entire diameter of the stem. This facilitates secondary infections by other insects and even more frequently by microorganisms (Mendonça et al., 1996). Therefore, the search for new alternatives for the control of this pest is of great importance for sugarcane producers.

In this context, a *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) encoded entomotoxic protein (Cry) has been investigated for potential control of sugarcane giant borer neonate larvae. *Bt* is an aerobic, gram-positive bacterium that synthesizes crystalline inclusions during its sporulation that are composed of one or more Cry toxins and/or Cyt toxins (Höfte and Whiteley, 1989; Silva-Werneck and Ellar, 2008). Cry toxins are presently classified into 58 types (Cry1–Cry58) and many sub-types (e.g. Cry1Aa and Cry1Ba) based on their amino acid sequence similarity. They are active against a limited number of

* Corresponding author at: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, PqEB-Final W5 Norte s/n, CP 02372, CEP 70770-900, Brasília, DF, Brazil.

Tel.: +55 61 3448 4902; fax: +55 61 3340 3624.

E-mail address: fatimasa@cenargen.embrapa.br (M.F. Grossi-de-Sa).

susceptible insect species (including lepidopterans, coleopterans and dipterans) and also against nematodes (Bravo and Soberón, 2008). A major group of Cry toxins is the three-domain (3D)-Cry family, members of which share similarities in sequence and structure. At least two different hypotheses have been proposed to explain the mode of action of these toxins, one relating to formation of pores in the target insect midgut and the other involving signal transduction. For both models, the first step is similar, i.e. the crystals are ingested by the larvae and solubilised in the midgut into protoxins. These are cleaved by midgut proteases to give rise to an active 60 kDa 3D-Cry toxin. The activated toxin binds to a cadherin receptor that is located in the midgut microvilli (Bravo and Soberón, 2008). The pore formation model suggests that this interaction with a cadherin receptor facilitates the proteolytic removal of the Cry α 1-helix, triggering toxin oligomerisation that results in pore formation, causing larval death. In contrast, the signal transduction model proposes that binding of monomeric toxin to a cadherin receptor activates an adenyl cyclase/protein kinase A magnesium-dependent signalling pathway, resulting in cell lysis (Bravo and Soberón, 2008; Zhang et al., 2006).

The spectrum of insects controlled by *Bt* can be broadened by directed molecular evolution techniques, such as DNA shuffling (Lassner and Bedbrook, 2001). DNA shuffling coupled with the phage-display technique has been valuable for the generation of genetic diversity and for selection of variants showing binding affinity to specific protein targets. DNA shuffling is an *in vitro* recombination method that uses small homologous DNA sequence fragments as substrates for PCR reactions, aiming to produce populations of gene variants (Stemmer, 1994; Zhao and Arnold, 1997). This technique has been used for several applications in different fields, including the generation of new molecules conferring resistance to insect pests (Patten et al., 1997). The phage-display approach involves the presentation of peptide and protein libraries on the surface of phage particles for facilitated selection of proteins with high affinity and specificity for a determined target (Willats, 2002).

In a previous study, it was reported that Cry11a12 protein exhibits considerable toxicity against the lepidopteran fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*), indicating a potential for activity against other lepidopteran species (Grossi-de-Sa et al., 2007). Since the *cry11a12* gene was isolated by our research group and our bank of *cry* genes is still under construction, the *cry11a12* gene was therefore used to initiate the prospection and development of Cry toxins against *T. l. licus*. For this purpose, the nucleotide sequence of the original *cry11a12* gene was first changed to accommodate plant codon usage, resulting in *cry11a12synth*. Considering that Cry11a12synth is not toxic to *T. l. licus*, the aim of this work was to use the *cry11a12synth* gene to generate and select protein variants with toxicity towards *T. l. licus*. Then, DNA shuffling coupled with phage-display was used to generate a *cry11a12synth* combinatorial library. Screening of this combinatorial library for *cry11a12synth* variants that bind to Brush Border Midgut Vesicles (BBMVs) of *T. l. licus* resulted in the identification of new *cry11a12synth* molecules with entomotoxicity towards sugarcane giant borer larvae.

2. Materials and methods

2.1. Midgut dissection

T. l. licus second and third instar larvae, available in the field solely during part of sugarcane season, were collected in a sugarcane plantation in Maceió, AL, Brazil. The larval midguts were extracted and transferred to a microcentrifuge tube with MET buffer (300 mM mannitol, 5 mM EGTA, 17 mM Tris, pH 7.5) containing 1 mM PMSF. Then, midguts were centrifuged at 2500 \times g for 5 min at 4 °C, the pellet was washed twice with MET buffer. The

resulting pellet, enriched with midguts, was stored at –80 °C until use.

2.2. Preparation of brush border membrane vesicles (BBMVs)

Preparation of BBMVs from the dissected midguts of *T. l. licus* larvae was performed by using the precipitation method described by Wolfersberger et al. (1987). The concentration of BBMVs proteins was determined by the Bradford assay (Bradford, 1976) using bovine serum albumin (BSA) as the standard for the calibration curve.

2.3. *cry11a12synth* gene

Previously, the *B. thuringiensis* S811 Brazilian strain, obtained from the collection of EMBRAPA Genetic Resources and Biotechnology, was used to isolate the *cry11a12* gene (Grossi-de-Sa et al., 2007) (GenBank accession no. AY788868). For the present work, the original *cry11a12* nucleotide sequence coding solely for the truncated toxin (lacking the C-terminus, i.e. consisting of the N-terminus and the domains I–III) was changed in order to accommodate plant genetic codon usage and named *cry11a12synth*. The *cry11a12synth* gene (1944 bp) was synthesized by Epoch Biolabs, Texas, US and cloned into the pBluescript II vector (Stratagene). The resulting sequence of *cry11a12synth* gene was deposited in the NCBI gene databank under accession number FJ938022.

2.4. DNA shuffling

First, the *cry11a12synth* gene was excised from the pBluescript II harbouring vector by digestion at 37 °C for 16 h under the following conditions: 5 μ g plasmid DNA, 10 U *Not* I (Promega), 20 U *Sal* I (New England Biolabs), 1 \times Buffer D (Promega), 10 μ g/mL BSA, in a 20 μ L final volume. The digestion products were analysed by 1% agarose gel electrophoresis and the fragment corresponding to the *cry11a12synth* insert (1944 bp) was excised and purified from the agarose gel using the GeneClean II Kit (Bio 101). Then, 10 μ g of the purified *cry11a12synth* gene was digested with 12.5 U of DNase I (Invitrogen) at 15 °C for 15 min and then interrupted by addition of 5 μ L of 0.5 M EDTA. Resulting fragments of 30–50 bp were jointly purified from a 2.5% agarose gel by using the High Pure PCR Product Purification Kit (Roche). Ten microlitres of the pool of purified fragments was used as template in a PCR without primers in a 25 μ L final volume containing 0.4 mM dNTPs, 1 mM MgSO₄ and 2.5 U Platinum *Taq* DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen), in 5 \times Platinum *Taq* DNA Polymerase High Fidelity buffer. The conditions of the primerless PCR were: 2 min 95 °C; 44 cycles: 1 min 95 °C, 1 min 42 °C and 1 min 72 °C (with a 5 s increase in extension time per cycle); with a final step of extension for 7 min at 72 °C. The products of the primerless PCR (1.5 μ L) were used as template for a second PCR, containing the forward primer Cry11a12synthFOR (5'-CCCGG-CCCAGCGGCCATGAACTCAAGAAC-3') and the reverse primer Cry11a12synthREV (5'-CCGCGCGGCTGGCCTTCGTAAGTAAGTTC-3'). Both primers encode an *Sfi* I site, which is adequate for later cloning into the pCOMB3X phagemid (Andris-Widhopf et al., 2000). The second PCR, performed in a 100 μ L final volume, contained 0.2 mM dNTPs, 2 mM MgSO₄, 0.8 μ M each primer, 5 U *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen) and 5 U Platinum *Taq* DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen), in 1 \times Platinum *Taq* Buffer. The conditions for the second PCR were: 2 min 95 °C; 10 cycles: 30 s 95 °C, 1 min 42 °C and 1 min 72 °C; followed by 14 cycles: 1 min 95 °C, 1 min 42 °C and 1 min 72 °C (with 20 s increase in extension time per cycle); with a final step of extension for 10 min at 72 °C. The second PCR product corresponding to the DNA shuffling product was analysed by 1% agarose gel electrophoresis

and MMB5 (5'-CGTCCATTGCATTCITTTAAT-3'), respectively. The primers TLL3IF (5'-TGTGTCCAGCCAATATATCG-3') and TLL3IR (5'-GTTGCCGTGTGGTTCCT-3') were designed to determine the variants' intermediate sequences. The nucleotide sequences were analysed using the BLASTn and BLASTx algorithms (Altschul et al., 1997), available on the web (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>). Sequence alignments were performed by the ClustalW program (Thompson et al., 1994), available on the web (<http://www.expasy.org/>). In order to assemble the sequenced fragments and identify the positions of the mutated residues, the variant sequences were compared with the *cry11a12synth* parental sequence using the Staden Package program (Staden, 1996).

2.10. Molecular modelling

Sequence homology to Cry11a12synth was sought in the Protein Database Bank—PDB at the NCBI web site by using BLASTp with default parameters (Altschul et al., 1997). The resulting sequence was aligned by using MUSCLE (Edgar, 2004) and further analyzed with JALVIEW (Clamp et al., 2004). After manual refinement of the sequence alignment, a homology model of Cry11a12synth and four variants was generated using MODELLER, Version 9.6 (Sali and Blundell, 1993). Default regimes of model refinement by energy minimisation and simulated annealing were employed. A rigorous interactive modelling protocol was adopted in which 20 models were constructed and analysed for each variant alignment. These models were analysed for stereochemical properties by using PROCHECK (Laskowski et al., 1993). When no further improvements could be achieved, the model with the best PROCHECK score was taken as the final model. Diagrammatic representations of the structures were generated by using PyMOL (DeLano, 2002).

3. Results

3.1. Generation of a *cry11a12synth* combinatorial library

The *cry11a12* gene (Grossi-de-Sa et al., 2007) had its nucleotide sequence modified (hereafter referred to as *cry11a12synth*) to conform to plant codon usage, facilitating its future use in plants for transgenic protection against insect pests. Besides changes in codon usage, the *cry11a12synth* gene coding sequence was also reduced to comprise only the active part of the original *cry11a12* molecule. Thus, the C-terminal domain, known to be dispensable for the toxicity of Cry proteins, was deleted. Consequently, the *cry11a12synth* gene is comprised of a 1944 bp open reading frame encoding a predicted protein of 648 residues, whereas the *cry11a12* gene is 2160 bp long and encodes a protein of 719 amino acids. For DNA shuffling purposes, the purified *cry11a12synth* parental gene was fragmented with DNaseI. The resulting fragments in the 30–50 bp range were recombined by primerless PCR. After a subsequent PCR reaction containing suitable primers to recover mutated *cry11a12synth* sequences, a population of *cry11a12synth* variants was obtained and visualised as a 1944 bp band (data not shown). This band was excised from the gel, purified and cloned into the pCOMB3X phagemid between two *Sfi* I restriction sites (Fig. 1). XL-1 Blue *E. coli* cells transformed with the resulting pCOMB3X-*cry11a12synth* constructs generated a phage-display combinatorial library of *cry11a12synth* variants containing 1.97×10^5 colony-forming units (cfu)/mL (Fig. 2).

3.2. Selection of *Cry11a12synth* variants binding to *T. l. licus* BBMVs (biopanning)

In order to select the clones expressing *Cry11a12synth* variants that bind specifically to the *T. l. licus* midgut, the phage-display com-

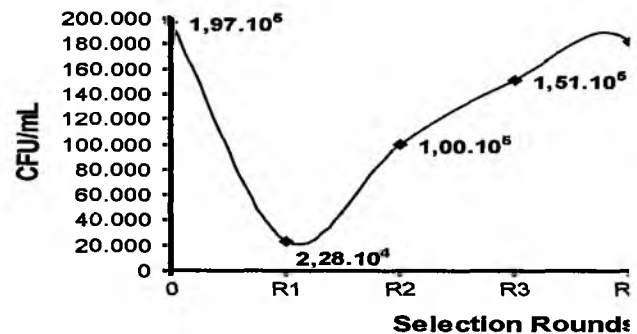


Fig. 2. Biopanning screening of the *cry11a12synth* Phage display combinatorial library for interactions of *Cry11a12synth* variants with Brush Border Midgut Vesicles (BBMVs) from sugarcane giant borer larvae (*T. l. licus*). The graph shows the number of phage-infected bacterial colonies obtained from each round of biopanning. In the second and third rounds of biopanning occurred the enrichment of recombinant phages displaying *Cry11a12synth* variants specifically bound to *T. l. licus* BBMVs. The points of the curve indicate the library titres in colony-forming units (cfu)/mL.

binatorial library was used for biopanning. Five selection rounds were performed. The second and third rounds were chosen since they yielded phage showing the highest binding specificity to *T. l. licus* BBMVs (Fig. 2). Four hundred randomly chosen clones from the second and third rounds exhibited amplicons corresponding to the original gene size of 1944 bp (data not shown). The expression of the variant proteins was confirmed by dot blot detection of the hemagglutinin (HA) epitope fused to the variant proteins. A reaction signal was observed in the dot blot for most of the analysed clones (data not shown). Thirty clones that showed an expression signal in the dot blot analyses were randomly selected for further analysis of activity against *T. l. licus*.

3.3. Bioassays of the anti-*T. l. licus* activity of *Cry11a12synth* and its variants

Bioassays to test the activity of *Cry11a12synth* and the 30 selected *Cry11a12synth* variants against *T. l. licus* were conducted by feeding neonate larvae an artificial diet containing 10 µg/mL of the proteins expressed in fusion with M13 phage. Incubation of larvae either with a *Cry11a12synth* protein-supplemented diet or a diet with no supplementation (negative control) resulted in a mortality rate of about 25%, indicating that *Cry11a12synth* protein is not active against *T. l. licus* at the concentration tested (Fig. 3). On the other hand, four out of the thirty *Cry11a12synth* variants tested had a statistically significant effect on *T. l. licus* as compared to the non-supplemented diet (Fig. 3). The analysis of variance was significant for the mortality rates of these four variants ($F=20.10$; $p<0.0001$). Statistical analysis to compare the average mortality rate revealed that the variants had similar toxicity to each other and higher toxicity than *Cry11a12synth* (Fig. 3).

3.4. Analysis of the mutations in the active *Cry11a12synth* variants

The four *Cry11a12synth* variants previously demonstrated to be active against *T. l. licus* were sequenced, and after assembly and alignment analysis, these new variant sequences were deposited in the NCBI gene databank under assigned accession numbers FJ938023 to FJ938026, respectively corresponding to *cry11a12synth* variants 1–4. The *cry11a12synth* gene and its four shuffled variant genes encode proteins of 648 amino acid residues. Sequence alignments comparing parental *cry11a12synth* and its variants identified numerous nucleotide substitutions. Most of these nucleotide substitutions resulted in silent mutations, but a few resulted in amino acid residue substitutions (mutations). No deletions were obtained

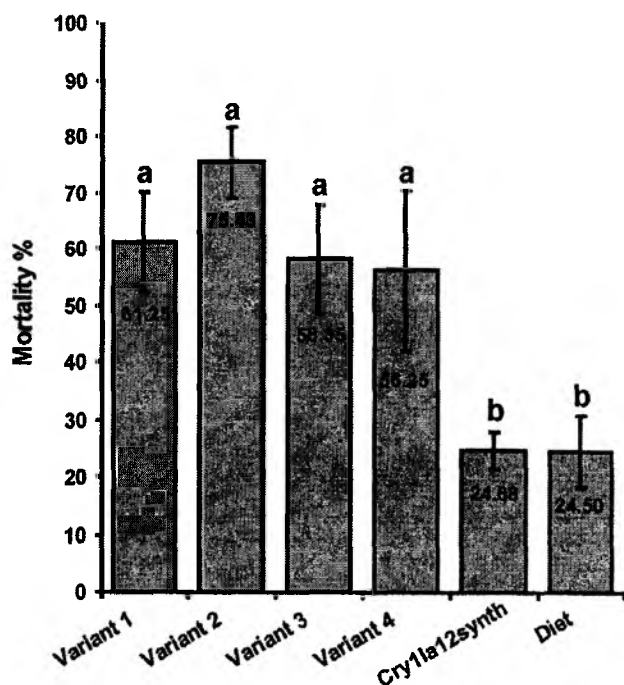


Fig. 3. Bioassays of Cry11a12synth and variants against *T. l. licus*. Treatments consisted of artificial diet supplemented or without Cry11a12synth protein or its variants. Average mortality rates (%) are plotted (vertical bars) and corresponding values are indicated. The standard deviation is indicated for each treatment (vertical lines). Average mortality rate values with different letters differ from each other by the Tukey's test at a probability of 5%.

(Table 1). Most of the changes in amino acid sequence were found in domain I, with a few changes found in domain III and none in domain II (Table 1).

To try to predict the effects of the mutations on structure and function, theoretical models were built for Cry11a12synth and the four variants by using Cry8Ea1 and Cry3Bb1 (PDB entries 3EB7 and 1J16, respectively) (Galitsky et al., 2001; Guo et al., 2009) as templates. Models were chosen for Cry11a12synth and its variants according to PROCHECK analysis. In the template crystal structures chosen (i.e. E3B7 and 1J16) there are no defined atomic coordinates to serve as templates to model N- and C-termini of the Cry11a12synth variant structures. Therefore, the models of the Cry11a12synth variants correspond to residues 62–643 (residue numbers of the Cry primary sequences), lacking the N- and C-termini but containing the three conserved domains of the Cry toxin structure (Fig. 4A).

The theoretical tertiary structure of Cry11a12synth depicts the location of the eight substitutions present in variants 1–4 (Fig. 4A). Three substitutions are located in domain I (Fig. 4A): (i) I116T, in variant 3, located in the loop between alpha2b and alpha3; (ii)

Table 1
Mutations present in Cry11a12synth variants.

Variant	Substitution mutation	Domain
1	D233N	I
	E639G	III
2	D233N	I
3	I116T	I
	L266F	I
	K580R	III
4	M45V	N-terminus
	D233N	I

D233N, in all variants except for variant 3, located in helix $\alpha 6$; and (iii) L266F, in variant 3, located in helix $\alpha 7$. Two mutations were found in domain III: (i) K580R, in variant 3, located in strand $\beta 16$; and (ii) E639G, in variant 1, located in strand $\beta 19$.

4. Discussion

The gene *cry11a12*, previously isolated by our group from *B. thuringiensis* S811 strain, encodes a protein proven to be highly effective against the lepidopteran species *S. frugiperda*. In the present work, we generated a combinatorial phage-display library of variants of *cry11a12synth* via DNA shuffling and successfully identified four variants with optimised activity against *T. l. licus*.

In the last decade, directed molecular evolution techniques, such as DNA shuffling, have been employed in the agricultural research to create genes, such as the *cry* genes, encoding insecticidal molecules for the development of transgenic insect-resistant plants (Lassner and Bedbrook, 2001). The DNA shuffling strategy used here was highly efficient for our purposes, as it generated 1.97×10^5 variants of *cry11a12synth*, out of which over 400 bound specifically to *T. l. licus* BBMV. Furthermore, four out of 30 tested variants presented activity against sugarcane giant borer neonate larvae when compared to the non-toxic Cry11a12synth.

In comparison to conventional bacterial expression systems, the phage-display system, in addition to providing soluble, ready-to-use protein, has advantages for the selection of variants that include speed, ease of use and low cost. However, previous studies (Kasman et al., 1998; Marzari et al., 1997) have encountered problems with the functionality of proteins displayed on M13 phage. It was found that the Cry1Aa toxin was not properly displayed, resulting in deletions of the fused protein. Moreover, despite the fact that Cry1Ac toxin displayed by M13 phage retained its toxicity against *Manduca sexta* larvae, there was no binding to functional insect midgut receptors *in vitro*, suggesting structural restrictions of the displayed toxin (Pacheco et al., 2006). In spite of these limitations previously related in the literature, our group apparently established optimal conditions that overcame such constraints to successfully express Cry11a12synth protein variants with the M13 phage-display system.

When considering the four Cry11a12synth variants active against sugarcane giant borer larvae, eight mutation sites of amino acid substitutions were found. Out of these eight, half resulted in substitutions of nonpolar residues, whereas the other half resulted in substitution of charged residues. Moreover, it was observed that most of these mutations were found in domain I of the Cry11a12synth active variants. One of the roles of the Cry domain I is the insertion of the protein into the membrane. Dean et al. (1996) using Y153D, Y153A and Y153R substitutions in CryIAb domain I, demonstrated that the negatively charged residue D was less favourable for toxin insertion into membranes than the positively charged R or neutral A residues. Another biological role attributed to Cry domain I is the formation of pores. Girade et al. (2009) demonstrated with Cry1Aa mutations in the $\alpha 4$ and $\alpha 5$ helices and the $\alpha 3$ – $\alpha 4$ and $\alpha 5$ – $\alpha 6$ adjacent loops that these regions have an important role in the pore formation mechanism. Therefore, mutations located in domain I of the Cry11a12synth variants may have influenced their insertion into the membrane or pore formation in the midgut of *T. l. licus*.

In our work, two mutations in active Cry11a12synth variants were found in domain III, a domain associated with protection of Cry from proteolysis, with receptor binding and with regulation of pore formation (Flores et al., 1997). In this respect, there is evidence that domain III of Cry proteins is involved in binding to membrane proteins of the *Spodoptera exigua* midgut, demonstrating that domain III of CryIC can play an important role in toxicity to insect pests (de Maagd et al., 1996).

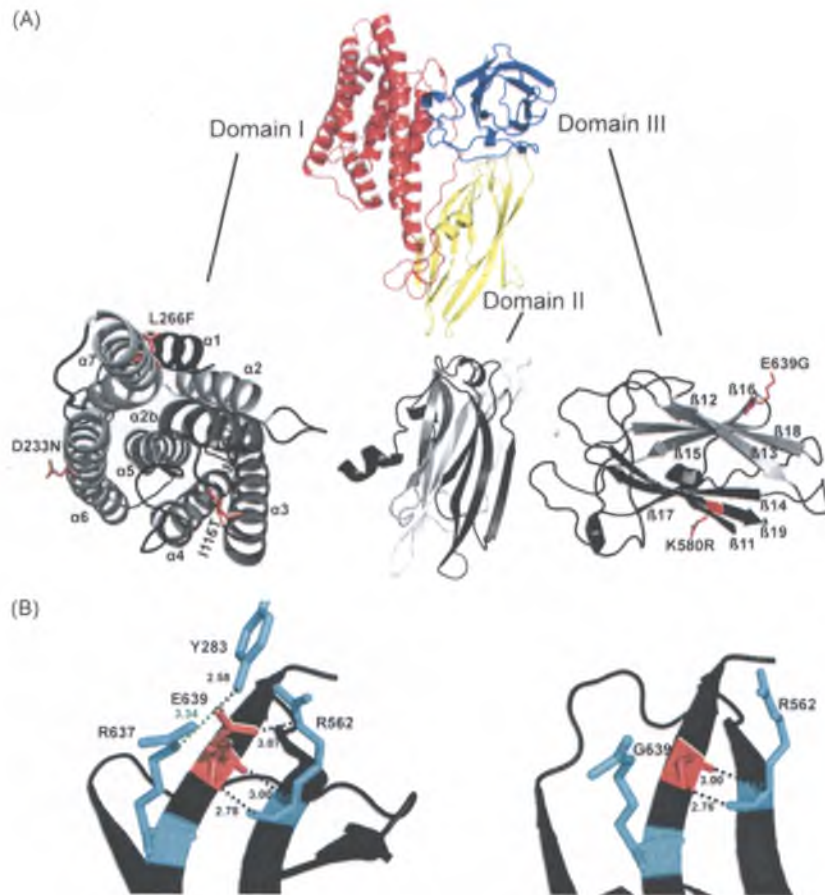


Fig. 4. Theoretical models of Cry11a12synth and variants. (A) A Cry11a12synth ribbon diagram, as viewed using PyMOL, is depicted at the top of panel A. Domain I is shown in red, domain II in yellow and domain III in blue. Separate models of each Cry11a12synth domain is shown in detail at the bottom of panel A. α -helices and β -strands are identified. Amino acid single substitutions present in the variants are coloured in red. The black dashed lines represent hydrogen bonds and the green dashed lines represent salt bridges. (B) Details of an amino acid substitution present in Cry11a12synth variant 1 (right), as compared to the parental Cry11a12synth (left). The variant 1 presents the mutation E639G, located in the β 19 strand in domain III. The model on the left depicts the interactions between residue E639 (in red) and residues Y283 (from block 2), R562 (from block 4) and R637 (from block 5) (in cyan). These interactions are disrupted in Cry11a12synth variant 1 (right).

Taken alongside previous data in the literature, our molecular modelling analysis provides potential explanations for the activity of the four variants:

- (i) In all Cry proteins, there are three conserved blocks, denoted blocks 2, 4 and 5, that are associated with the functionality of the toxins (Schnepf et al., 1998). In reference to the mutation E639G found in variant 1, G639 interacts solely with residue R562 from block 4 through two hydrogen bonds of around 3 Å, whereas in the Cry11a12synth protein, E639 interacts with Y283 from block 2 through a hydrogen bond of 2.58 Å, with R562 from block 4 through three hydrogen bonds of around 3 Å, and with R637 from block 5 through a salt bridge of 3.34 Å (Fig. 4B). Moreover, the mutation E639G of variant 1 is located in the β 19 strand of domain III, a domain associated with protection of the toxin from proteolysis, binding to midgut receptors, regulation of pore formation (Flores et al., 1997) and binding to insect midgut membrane proteins (de Maagd et al., 1996).
- (ii) Variant 2 contains the single mutation D233N. The residue at this position, be it D233 or N233, invariably presents its side chain to the solvent environment. These residues neither interact with nor belong to any region known to be relevant to the entomotoxic activity of Cry proteins. Nevertheless, the substitution of an oxygen from D233 for a nitrogen in N233 makes this spot on the toxin less negative, which might affect the

- interactions of the toxin with the solvent environment. To elucidate the role of this mutation in the functionality of variant 2, it would be interesting to perform modelling studies of molecular dynamics in order to better understand the movement of the side chain of residue 233 in relation to simulated changes in environmental conditions. Modelling studies of Cry11a12synth or variant 2 docking to the Cry receptor might also be revealing. Moreover, bench experiments involving site-directed mutagenesis of residue 233 and its consequences on interactions with the receptor and protein toxicity could shed light on the role of this residue in Cry functionality.
- (iii) Three mutations occurring in variant 3 seem to present an interactive effect on the variant's structure, and consequently probably also on the variant's biological activity. Concerning the mutation I116T, the oxygen of T116 interacts with the beta-carbon of residue A120. This residue corresponds to residue A92 from Cry1Ab, which is involved in the insertion of the Cry toxin into the insect midgut membrane (Chen et al., 1995). Regarding the mutation L266F, L266 has its side chain turned towards the residues E455 (domain II), D270 and R262 (domain I). Thus the aromatic ring of F266, which is a less reactive residue than L266, interferes with interactions between domains I and II. With respect to the mutation K580R, both K580 and R580 are turned towards the neighbouring N578, which corresponds to the Cry1Ac N546 residue demonstrated to be related to Cry1Ac toxicity (Xiang et al., 2009).

Since the first 61 residues corresponding to the N-terminal portion of Cry11a12synth were not modelled, the effect of the mutation M45V present in variant 4 could neither be modelled nor analysed.

This work presents a pioneering approach towards the generation and selection of new genes to be used in the development of transgenic sugarcane resistant to the giant borer *T. l. licus*, a pest that is extremely resistant to conventional control methods and for which there is no known natural source of resistance. It should be noted that additional experiments, such as site-directed mutagenesis and modelling studies of molecular dynamics and interactions with the receptor are needed to better understand the effects of the mutations present in the Cry11a12synth variants on the biological activity of these proteins against *T. l. licus*. It will be also interesting to test these toxins against to others insect pest and non-target beneficial insects. In conclusion, the Cry11a12synth variants 1 to 4 are active against sugarcane giant borer larvae and are therefore promising proteins for the future development of transgenic sugarcane resistant to insect pests.

Acknowledgments

The present work was performed with financial support from CNPq, CAPES and EMBRAPA. The authors thank: Dr. Andréa Maranhão (University of Brasília, Brazil) for kindly providing the pCOMB3X phagemid and support about phage-display approaches; Dr. Dan Rigden (University of Liverpool, UK) for critical reading; Mr. Luiz Avelar Brandão Góis (Phytosanitary Supervisor, Usina Triunfo, AL, Brazil) for sending us the giant borer larvae and Dr. Eduardo Alano Vieira (EMBRAPA Cerrados, Planaltina, DF, Brazil) for the aid in statistical analyses.

References

- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389–3402.
- Andris-Widhopf, J., Rader, C., Steinberger, P., Fuller, R., Barbas III, C.F., 2000. Methods for the generation of chicken monoclonal antibody fragments by Phage display. *J. Immunol. Methods* 242, 159–181.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Bravo, A., Soberón, M., 2008. How to cope with insect resistance to Bt toxins? *Trends Biotechnol.* 26, 573–579.
- Chen, X.J., Curtiss, A., Alcántara, E., Dean, D.H., 1995. Mutations in Domain I of *Bacillus thuringiensis* δ -Endotoxin CryIAb reduce the irreversible binding of toxin to *Manduca sexta* brush border membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* 270, 6412–6419.
- Clamp, M., Cuff, J., Searle, S.M., Barton, G.F., 2004. The Jalview Java alignment editor. *Bioinformatics* 20, 426–427.
- Cruz, C.D., 2001. Programa Genes (versão Windows): aplicativo computacional em genética e estatística. Editora UFV, Viçosa.
- de Maagd, R.A., Kwa, M.S.G., Klei, V.D., Yamamoto, T., Schipper, B., Vlak, J.M., Stiekema, W.J., Bosch, D., 1996. Domain III substitution in *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin CryIA(b) results in superior toxicity for *Spodoptera exigua* and altered membrane protein recognition. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1537–1543.
- Dean, D.H., Rajamohan, F., Lee, M.K., Wu, S.-J., Chen, X.J., Alcántara, E., Hussain, S.R., 1996. Probing the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins by site-directed mutagenesis—a minireview. *Gene* 179, 111–117.
- DeLano, W.L., 2002. The PyMOL Molecular Graphics System on the World Wide Web.
- Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32, 1792–1797.
- Flores, H., Soberón, X., Sánchez, J., Bravo, A., 1997. Isolated domain II and III from the *Bacillus thuringiensis* CryIAb delta-endotoxin binds to lepidopteran midgut membranes. *FEBS Lett.* 414, 313–318.
- Galitsky, N., Cody, V., Wojtczak, A., Ghosh, D., Luft, J.R., Pangborn, W., English, L., 2001. Structure of the insecticidal bacterial delta-endotoxin Cry3Bb1 of *Bacillus thuringiensis*. *Acta Crystallogr., Sect. D* 57, 1101–1109.
- Girarde, F., Vachon, V., Lebel, G., Préfontaine, G., Scgwartz, J.-L., Masson, L., Laprade, R., 2009. Chemical modification of *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin single-cysteine mutants reveals the importance of domain I structural elements in the mechanism of pore formation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1788, 575–580.
- Grossi-de-Sa, M.F., Magalhães, M.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.S., Soares, L.H.B., Ayub, M.A.Z., Siqueira, H.A.A., Figueira, E.L.Z., 2007. Susceptibility of *Anthonomus grandis* (Cotton Boll Weevil) and *Spodoptera frugiperda* (Fall Armyworm) to a Cry11a-type toxin from a Brazilian *Bacillus thuringiensis* strain. *J. Biochem. Mol. Biol.* 40, 773–782.
- Guo, S., Ye, S., Liu, Y., Wei, L., Xue, J., Wu, H., Song, F., Zhang, J., Wu, X., Huang, D., Rao, Z., 2009. Crystal structure of *Bacillus thuringiensis* Cry8Ea1: An insecticidal toxin toxic to underground pests, the larvae of *Holotrichia parallela*. *J. Struct. Biol.* 168, 259–266.
- Höfte, H., Whiteley, H.R., 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* 53, 242–255.
- Kasman, L.M., Lukowiak, A.A., Garczynski, S.F., McNall, R.J., Youngman, P., Adang, M.J., 1998. Phage display of a biologically active *Bacillus thuringiensis* toxin. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2995–3003.
- Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S., Thornton, J.M., 1993. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.* 26, 283–291.
- Lassner, M., Bedbrook, J., 2001. Directed molecular evolution in plant improvement. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4, 152–156.
- Marzari, R., Edomi, P., Bhatnagar, R.K., Ahmad, S., Selvapandian, A., Bradbury, A., 1997. Phage display of a *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin. *FEBS Lett.* 411, 27–31.
- Mendonça, A.F., 1982. A broca gigante *Castnia licus* Drury, 1770 (Lepidoptera: Castniidae) no Brasil. *Saccharum APC*, São Paulo.
- Mendonça, A.F., Viveiros, A.J.A., Sampaio, F.F., 1996. A broca gigante da cana-de-açúcar, *Castnia licus* Drury, 1770 (Lep.: Castniidae). *Pragas da cana-de-açúcar. Insetos, Cia., Maceió*, pp. 133–167.
- Pacheco, S., Gómez, I., Sato, R., Bravo, A., Soberón, M., 2006. Functional display of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin on T7 phage. *J. Invertebr. Pathol.* 92, 45–49.
- Patten, P.A., Howard, R.J., Stemmer, W.P.C., 1997. Applications of DNA shuffling to pharmaceuticals and vaccines. *Curr. Opin. Biotechnol.* 8, 724–733.
- Rader, C., Steinberger, P., Barbas III, C.F., 2001. Selection from Antibody Libraries. In: Barbas III, C.F., Burton, D.R., Scott, J.K., Silverman, G.J. (Eds.), *Phage Display: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 10.1–10.20.
- Sali, A., Blundell, T.L., 1993. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* 234, 779–815.
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D.R., Dean, D.H., 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 775–806.
- Scott, J.K., Barbas III, C.F., 2001. Phage-display Vectors. In: Barbas III, C.F., Burton, D.R., Scott, J.K., Silverman, G.J. (Eds.), *Phage Display: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 2.1–2.19.
- Silva-Werneck, J.O., Ellar, D.J., 2008. Characterization of a novel Cry9Bb δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.* 98, 320–328.
- Staden, R., 1996. The staden sequence analysis package. *Mol. Biotechnol.* 5, 233–241.
- Stemmer, W.P.C., 1994. Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Letts. Nat.* 370, 389–391.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673–4680.
- Willats, W.G.T., 2002. Phage display: practicalities and prospects. *Plant Mol. Biol.* 50, 837–854.
- Wolfersberger, M., Luethy, P., Maurer, A., Parenti, P., Sacchi, F.V., Giordana, B., Hanozet, G.M., 1987. Preparation and partial characterization of amino acid transporting brush border membrane vesicles from the larval midgut of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). *Comp. Biochem. Physiol.* 86, 301–308.
- Xiang, W.F., Qiu, X.L., Zhi, D.X., Min, Z.X., 2009. N546 in β 18- β 19 loop is important for binding and toxicity of the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *J. Invertebr. Pathol.* 101, 119–123.
- Zhang, X., Candas, M., Griko, N.B., Taussig, R., Bulla Jr., L.A., 2006. A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 9897–9902.
- Zhao, H., Arnold, F.H., 1997. Optimization for DNA shuffling for high fidelity recombination. *Nucleic Acids Res.* 25, 1307–1308.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Improving Cry8Ka toxin activity towards the cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*)

Gustavo R Oliveira^{3,7}, Maria CM Silva³, Wagner A Lucena^{2,3,5}, Erich YT Nakasu³, Alexandre AP Firmino^{3,5}, Magda A Beneventi³, Djair SL Souza¹, José E Gomes Jr^{1,3}, José DA de Souza Jr^{1,3}, Daniel J Rigden⁴, Hudson B Ramos¹, Carlos R Soccol⁷ and Maria F Grossi-de-Sa^{3,5,6*}

Abstract

Background: The cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*) is a serious insect-pest in the Americas, particularly in Brazil. The use of chemical or biological insect control is not effective against the cotton boll weevil because of its endophytic life style. Therefore, the use of biotechnological tools to produce insect-resistant transgenic plants represents an important strategy to reduce the damage to cotton plants caused by the boll weevil. The present study focuses on the identification of novel molecules that show improved toxicity against the cotton boll weevil. *In vitro* directed molecular evolution through DNA shuffling and phage display screening was applied to enhance the insecticidal activity of variants of the Cry8Ka1 protein of *Bacillus thuringiensis*.

Results: Bioassays carried out with *A. grandis* larvae revealed that the LC₅₀ of the screened mutant Cry8Ka5 toxin was 3.15-fold higher than the wild-type Cry8Ka1 toxin. Homology modelling of Cry8Ka1 and the Cry8Ka5 mutant suggested that both proteins retained the typical three-domain Cry family structure. The mutated residues were located mostly in loops and appeared unlikely to interfere with molecular stability.

Conclusions: The improved toxicity of the Cry8Ka5 mutant obtained in this study will allow the generation of a transgenic cotton event with improved potential to control *A. grandis*.

Keywords: *Anthonomus grandis*, *Bacillus thuringiensis*, Cotton, DNA shuffling, Phage display, Molecular modeling

Background

Anthonomus grandis (Coleoptera: Curculionidae), commonly known as the cotton boll weevil, is the most harmful cotton-feeding insect-pest in the Americas [1-4]. Even in cotton fields where the insect has been considered eradicated (e.g. Mississippi State USA), the growers must maintain a continued vigil because of the tremendous ability of the boll weevil to return to previous controlled regions from time to time to re-infest. Millions of dollars in insecticides were spent by growers to have areas eradicated. In not eradicated areas, yield losses to boll weevil exceeded until 10 percent in certain years and the growers had to apply 8-12 boll weevil sprays per field [5]. These repeated treatments are necessary, because only adult boll weevils feed on tender

cotton terminals, on pollen from flower buds and on fruits. The larvae are protected inside the boll, which makes difficult the contact with chemical pesticides. Recently presented during forum Brazil' 2010/11, cotton area production is estimated at 1.2 million of hectares the highest since the early 1990's [6]. However, especially in Brazil, boll weevil is considered a key pest in cotton fields and despite of pest management and several insecticide sprays, an efficient boll weevil control does not exist. As an alternative to chemicals, the use of transgenic plants resistant to *A. grandis* presents a potential solution to the problem posed by insect-pests [7]. The development of genetically modified (GM) crops expressing Cry toxins has been widely researched due to the toxic effect of these molecules against insect-pests (lepidopterans, coleopterans and dipterans) and nematodes which attack and thereby affect the productivity of crops such as cotton [8]. These toxins are harmless to vertebrates and plants due their high

* Correspondence: fatimasa@cenargen.embrapa.br

³Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, PqEB- Final W5 Norte -Brasília, DF, Brasil

Full list of author information is available at the end of the article

specificity to the insect target. Since 1996, several insect-resistant GM cotton events have been used commercially throughout the world, including Bollgard[®] (expressing the *cry1Ac* protein) and Bollgard II[®] (expressing the *cry1Ac* + *cry2Ab* proteins) from Monsanto, Widestrike[®] (expressing the *cry1Ac* + *cry1F* proteins) from Dow Agrosiences and VipCot[®] (expressing *Vip3A* protein) from Syngenta/Deltapines. This technology has been used to control lepidopterans, allowing an increase in productivity, reductions in production costs, human intoxication and environmental damage due to a reduction in chemical pesticide application [9]. At the moment, however, none of the commercially available GM cotton events are effective against the cotton boll weevil, which is the most harmful cotton insect-pest in Latin America. Cry proteins are included in parasporal crystalline structures produced by *Bacillus thuringiensis* during sporulation [10,11]. Several hypothesis about the insecticidal mechanism of action of Cry toxins have been discussed in previous studies [12,13], including the pore formation model [8,13,14] and the signal transduction model [15]. More recently, Guo et al [16] proposed a plausible model for the initiation of Cry toxin domain disassembly before membrane penetration and pore formation. After ingestion, the crystals are solubilised and activated by insect midgut proteases. According to Bravo and Soberon [8], the binding of toxins to specific cadherin-like receptors triggers the oligomerization of toxin monomers. Directed by an aminopeptidase-N receptor, the oligomer is inserted into the cell membrane and forms a pore. Those pores are responsible for a net influx of ions and water, leading to disturbances in osmotic balance, cell lysis, midgut damage and insect death [8]. In the intracellular signalling model [15], the binding of toxins to the cadherin-like receptor triggers an Mg²⁺-dependent cAMP signalling pathway that promotes cell death. In both models, the affinity for cadherin receptors has been reported as the main step that determines specificity. Mutations in those receptors have been reported to be the cause of resistance acquisition [8]. Moreover, Broderick et al [17] suggested that the cry toxin activity is also dependent on the microorganisms of the insect midgut. Molecular strategies that involve structural and biochemical studies of Cry toxins, as well as the isolation and characterisation of new *cry* genes, are necessary to help elucidate the mechanisms of action of Cry toxins and also to select molecules that have the potential for improved toxicity and specificity [14].

In this context, DNA shuffling, as described by Stemmer [18] and following modifications reported by Zhao and Arnold [19], is the most commonly used technique to promote *in vitro* directed molecular evolution. In this technique, the introduction of random mutations into

the nucleotide sequences results in a pool of mutants from which proteins with improved function can be selected. Considering the biotechnological context, this technique has been used as a tool to generate libraries that contain variant genes encoding engineered proteins, which can subsequently be selected according to their potential agricultural or pharmaceutical use [20,21]. In a previous study reported by our group, a recombinant toxin produced by the *cry11a12* gene exhibited moderate toxicity towards first instar larvae from both the lepidopteran fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) (50% mortality with 5 µg.mL⁻¹) and the coleopteran cotton boll weevil (50% mortality with 230 µg. mL⁻¹) [22]. More recently, *cry11a12synth* (a *cry11a12* synthetic gene containing plant codon usage) was used in an approach applying DNA shuffling coupled with the phage display technique, which involves the presentation of peptide and protein libraries on the surface of phage particles for the facilitated selection of proteins with high affinity and specificity for a determined target [23]. Our data showed that this strategy was able to efficiently generate genetic diversity, and the screening of the combinatorial library for *cry11a12synth* variants resulted in the identification of novel molecules with improved entomotoxicity towards the sugarcane giant borer larvae, *Telchin licus* (Lepidoptera: Castniidae), an activity not exhibited by the wild-type protein encoded by the original *cry11a12* gene [24].

In a parallel manner, our team isolated a new gene classified as *cry8Ka1* (GenBank accession no. FJ422558) from a Bt strain that showed moderate toxicity to the cotton boll weevil [25]. The entomotoxicity of recombinant Cry8Ka1 protein expressed in *E. coli* bioassayed against *A. grandis* larvae was confirmed [25,4].

In the present study, the *cry8Ka1* gene was used in the combined DNA shuffling and phage display techniques to create novel Cry mutant toxins with improved activity towards the coleopteran *A. grandis*. Around 10⁵ Cry8Ka1 variants were generated, and the combinatorial library and screened phage selection allowed the isolation of new Cry toxins that exhibit improved toxicity against the boll weevil insect-pest. Among the screened Cry variants, Cry8Ka5 was selected for its high toxicity and potential use as a biotechnology tool for the generation of transgenic cotton plants. Analyses from theoretical models created for Cry8Ka1 and Cry8Ka5 toxin and comparison with other Cry toxin structures revealed that essential structural features are conserved.

2. Methods

2.1 Preparation of *A. grandis* Brush Border Membrane Vesicles (BBMVs)

Neonate *A. grandis* larvae were obtained from colonies grown at the Embrapa Genetic Resources and

Biotechnology Centre (Brasilia, Brazil) using an artificial diet [25]. The BBMV s were prepared from midguts of boll weevil larvae by Mg/EGTA precipitation and differential centrifugation [26]. The larval midguts were extracted and transferred to a microcentrifuge tube with MET (300 mM mannitol, 5 mM EGTA, 17 mM Tris, pH 7.5) containing 1 mM PMSF. Two hundred midguts were centrifuged at 2500 × g for 5 min at 4°C, and the pellet was washed twice with MET buffer. The concentration of BBMV s proteins was determined by the Bradford assay [27] using bovine serum albumin (BSA) as the standard for the calibration curve. The aliquots were stored to -80°C until use.

2.2 cry8Ka1 gene amplification

A *cry8Ka1* gene was previously isolated by our team from a collection of *Bacillus thuringiensis* at the Embrapa Genetic Resources and Biotechnology [25] was chosen for further studies because the encoded toxin had the potential to control the cotton boll weevil (*A. grandis*). First, the *cry8Ka1* gene (2001 bp), corresponding only to the active part of the toxin, was PCR-amplified from the original plasmid using Platinum *Taq* DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen) and the Cry8Ka1sfiF (5'CCCGGCCAGGCGGCCGACCACGCGTATCGA 3') and Cry8Ka1sfiR (5'CCCGGCCGCGCCTGGCCGTTCAAGGAACCGTT 3') primers, which introduced an *Sfi* I restriction site (underlined). The PCR program included the following steps: a denaturation step, consisting of 1 cycle at 95°C for 5 min; 29 cycles consisting of a denaturation step of 40 s at 95°C; a hybridisation step of 40 s at 45°C; an elongation step of 40 s at 72°C; and finally, a step consisting of 2 min at 72°C. The PCR amplification product was analysed by 1% agarose (w/v) gel electrophoresis, and the DNA (approximately 2000 bp) was excised and gel-purified using the GeneClean® II Kit (BIO 101).

2.3 Generation of a combinatorial library using DNA shuffling and phage display

The *Sfi* I-digested, PCR-amplified *cry8Ka1* gene was used as the starting material for the DNA-shuffling procedure [18,19]. First, 10 µg of the purified *cry8Ka1* gene was randomly digested in a mixture containing 70 U of DNase I enzyme (Invitrogen) in DNase I buffer (50 mM Tris buffer, pH 7.6, containing 1 mM MnCl₂ and 0.1 mg/mL BSA). The digestion reaction was performed at 15°C for 20 min and interrupted by the addition of 5 µL of 0.5 M EDTA. The digestion product was analysed by 2.5% agarose (w/v) gel electrophoresis and the 30-50-bp fragments were jointly purified using the High Pure PCR Product Purification Kit (ROCHE). Ten microliters of purified product were obtained by performing a PCR without primers in a 25-µL final volume containing 2.5

µM of each dNTP, 0.5 mM MgSO₄, and 2.5 U of Platinum® *Taq* DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen) in the supplied 1X buffer. A PCR program consisting of the following steps was used: 95°C for 2 min; 43 cycles of 95°C for 1 min; 44°C for 1 min and 72°C for 1 min (with a 5-s increase in extension time per cycle); and 7 min at 72°C. To reassemble the variant genes, the product of the primer-less PCR (7.6 µL) was used as template for a second PCR using the Cry8Ka1sfiF and Cry8Ka1sfiR primers. The PCR mixture had a final volume of 500 µL and contained 0.2 mM of each dNTP, 2 mM MgSO₄, 800 nM of each primer and 25 U of *Taq* (Phoentria)/Platinum® *Taq* DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen) (1:1 mixture) in the supplied 1X Platinum *Taq* buffer. The conditions for the second PCR were as follows: 2 min at 95°C; 10 cycles of 30 s at 95°C; 30 s at 45°C and 1 min at 72°C; 14 cycles of 30 s at 95°C; 30 s at 43°C and 42 s at 72°C (with a 20-s increase per cycle); and finally, 7 min at 72°C. All assembly reactions were performed in a Mastercycler gradient thermocycler (Eppendorf). The amplified shuffled product of approximately 2000 bp was analysed on a 1% agarose (w/v) gel, the single band of approximately 2000 bp was excised and the DNA was gel-purified using the GeneClean® II Kit (BIO 101). This product was digested using the *Sfi* I enzyme, and the variant genes (0.9 µg) were ligated into the pComb3X phagemid (3.6 µg) [28], which was also linearised using the *Sfi* I site. For a single reaction, T4 DNA ligase (Invitrogen) (12 U) and 5X ligase buffer were mixed to obtain a 200µL final volume. The ligation product was dialysed, lyophilised and dissolved in 15 µL of water and subsequently fractionated into five aliquots. Each aliquot (3 µL) was used to transform 60 µL of the electrocompetent XL1-Blue® strain of *Escherichia coli* (Stratagene), and the following procedures were carried out as first described by Barbas III et al. [29] using the same modifications that were previously reported in [24].

2.4 Selection of the Cry8Ka1 toxin variants that bind to A. grandis BBMV s (biopanning)

The biopanning procedure for screening the combinatorial library and selecting specific *cry8Ka1* toxin variants fused to phage particles was performed as described by Barbas III et al. [29] with modifications recently reported by Craveiro et al. [24]. At each round, wells in microtitre plate were coated with BBMV preparation (100 µg) and incubated 16 h at 4°C. After five rounds of selection, the clones from the cycle that exhibited the highest number of colony-forming units (cfus) were isolated and analysed to verify the integrity of the inserted *cry8ka1* variant genes via colony PCR using the Cry8Ka1sfiF and Cry8Ka1sfiR primers (described above). The clones that presented amplicons

around 2000 bp in length were further used for the expression of Cry8Ka1 variant proteins.

2.5 Expression of Cry8Ka (parental and variant gene toxins) in fusion phage particles

First, the parental *cry8Ka1* gene and several variants exhibiting size integrity (approximately 2000 bp) were expressed on the surface of M13 phage and analysed by immunodetection (Dot blot) exactly as reported in a previous study using the *cry11a12* gene and variants by Craveiro et al. [24].

2.6 Subcloning of cry8Ka1 and selected variant genes into vectors for expression in E. coli bacteria

To confirm that toxins expressed by phage fusion exhibited correct folding and activity, *cry8Ka1* and *cry8Ka5* variant genes were subcloned into the pET101/D TOPO (Invitrogen) plasmid according to the manufacturer's instructions. The CRY8PETF (5'CACCATGCGA-CACCTTCTACATCTG 3') and CRY8PETR (5'CTAAGAAGCGTAGTCCGGAAC 3') primers were used to insert recombinant sites into genes. The pET101-based expression constructions, Cry8Ka1PET101 and Cry8Ka5PET01, were used to transform *E. coli* cells of the BL21 (DE3) strain according to the manufacturer's instructions. One colony of the bacteria carrying each construct was cultivated at 37°C in 5 mL of Luria Bertani (LB) medium containing ampicillin (100 µg mL⁻¹) (i.e., LB selective medium), under vigorous agitation (200 rpm) until an OD_{600nm} of 0.6 was reached. This pre-inoculum suspension was used to inoculate 2 L of fresh LB selective medium, which was agitated for 6 h after induction by the addition of IPTG to a final concentration of 0.5 mM. Before induction, an aliquot of the culture cells was collected and reserved. Typically, cells were harvested by centrifugation (3000 × g, 10 min), and the pellet was resuspended using 1 mL of 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) buffer. Thereafter, the cell suspension was lysed by sonication and stored at -80°C until use. Final purification of His6X-tagged mature Cry8Ka1 and variant toxins was performed using affinity chromatography on 5 mL batches of Ni-NTA (QIAGEN) solid phase. The column equilibrium and chromatography conditions were performed according to the manufacturer's instructions. The eluted fractions were collected, dialysed against water and then lyophilised.

2.7 Western blotting analysis

The purified recombinant proteins were analysed using SDS-PAGE [30]. Typically, a 12% gel was loaded with 5 µg of each expressed protein (Cry8Ka1 and its selected mutants). After electrophoresis, the proteins in the gel were visualised by Coomassie Blue R-250 staining. For Western blotting, the protein samples were transferred

onto a HYBOND™-C EXTRA nitrocellulose membrane using a Trans-blot Semi-dry Transfer Cell (BioRad®). The solution used to block the membrane consisted of 2% (w/v) bovine serum albumin (BSA) in TBS (5 mM Tris-HCl, 15 mM NaCl, pH 7.5). Thereafter, the membrane was incubated with anti-His-AP conjugate (Invitrogen®) (1:2000 dilution in TBS) for 2 h at room temperature. After the membrane was washed three times using TBS-T (0.05% (v/v) Tween 20 (Sigma®) added to TBS), the immune reactive bands were detected by immersing the blot according to the manufacturer's instructions using an alkaline phosphatase conjugate substrate® kit (BioRad®).

2.8 Quantification of the expressed toxins (ELISA)

To quantify proteins expressed by *E. coli* (as described in 2.6), enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) were performed using the polyclonal rabbit anti-Cry8Ka1 antibody, which was previously produced and purified by our team (not shown). The concentration of purified proteins was first determined according to Bradford method [27]. For a standard curve, a serial dilution was performed using purified Cry8Ka1 toxin (4 ng to 0.0019 ng) in wells of a microtiter plate. The wells of the plate were protein immobilised for 24 h at 4°C and then blocked using a solution containing 3% (w/v) BSA in TBS-T buffer for 4 h at room temperature. Following the washes, the polyclonal anti-Cry8Ka1 antibody (diluted 1:10000 in TBS-T containing 1% BSA) was deposited and incubated for 16 h at 4°C. After washes, samples were incubated with anti-rabbit IgG secondary antibody conjugated to peroxidase (Bio-Rad) (diluted 1:1000) for 2 h at room temperature. The TMB Peroxidase EIA Substrate Kit® (BioRad) was used for detection according to the manufacturer's instructions, and the reaction was stopped with 1 N H₂SO₄. The absorbance was measured at 405 nm using Benchmark Plus (BioRad). The assays were carried out in triplicate.

2.9 Bioassays of Cry8Ka1 and variants using A. grandis larvae

To assess the toxicity of Cry8Ka1 and its variants against neonate *A. grandis* larvae the bioassays were performed in two different situations. In the first bioassays for fast screening of variants indicating toxicity, fusion phage-expressed Cry8ka1 and variants were utilized in artificial diet (10¹¹ pfu mL⁻¹ of phage-expressed). Later bioassays were repeated using expressed in bacteria and purified Cry8ka1 and variants (0, 3, 6, 9 and 12 µg/mL) showing significant toxicity in preliminary screening. In both, bioassays were carried out in six-well cell culture plates filled with artificial diet [18% (w/v) Agar, 2.72% (w/v) Brewer's yeast, 4.48% (w/v) Soybean protein, 2.72% (w/v) Wheat germ, 18% (w/v) Pharmamedia® ,

0.1% (w/v) Sorbic Acid, 0.9% (w/v) Ascorbic Acid, 2.72% (w/v) Glucose, 0.9% (w/v) Nipagin, 0.05% (w/v) Mineral salts, 0.45% (w/v) vitamin mixture] and phage-expressed (first bioassay) or Cry8Ka1 or variants (detected in dot blot analyses, data not shown)(second bioassay). Twelve larvae were placed in each well and the plate was incubated for seven days at 27°C (± 1) with 80% relative humidity and a 14-h photoperiod. An artificial diet containing no additional Cry proteins was used as the negative control. Each treatment was carried out in triplicate and the bioassay was repeated to until six different dates. After seven days, the number of surviving larvae was recorded for each treatment. Statistical analyses were performed to compare the average percent mortalities by ANOVA and Tukey's means comparison analysis using the SigmaStat[®] software vs. 3.1 (Systat Inc., San Jose, California, 2004). The LC50 (lethal concentration required to kill 50% of insects) obtained from bioassays performed using bacteria-expressed proteins was calculated by Probit analysis [31] using the Polo-Pc software (LeOra Software).

2.10 DNA sequence analysis

The nucleotide sequences of the *cry8Ka1* variant genes encoding toxins active against *A. grandis* larvae (according to bioassay analyses) were determined using a 3130xL Genetic Analyser (Applied Biosystems). To obtain the complete nucleotide sequences, several primers were used. 1) Primers designed to determine the N-terminal and C-terminal sequences were as follows: PCOMBF (5'-GCTTCCGGCTCGTATGTTGTGT-3') and PCOMBR (5'-CGTTTGCCATCTTTTCATAAT-3'). 2) Primers designed to obtain the intermediate sequences were as follows: Cry8INTERF (5'-CATATG CACAAGCTGCGAATT-3'), Cry8INTERR (5'-GCTTC CGGCTCGTATGTTGTGT-3'), Cry8ka5INTERF (5'-AGCGGATTTGGGCAATTCAG-3') and Cry8ka5INTERR (5'-TAACAGCTGGAATTTGAGGA-3'). The sequences were analysed using the BLASTn and BLASTp algorithms [32], which are available on the NCBI homepage <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>. In order to assemble the sequenced fragments and to identify the position of the mutated residues, multiple sequence alignment programs were used, including the STADEN PACKAGE (available at <http://staden.sourceforge.net/>) [33] and CLUSTALW (available at <http://www2.ebi.ac.uk/clustalw/>) [34].

2.11 Molecular analysis and homology modelling

Proteins showing homology to Cry8Ka1 were found in the nr database at the National Center for Biotechnology Information (NCBI) using BLAST with default parameters [32]. The resulting sequence set was aligned using Muscle [35]. Suitable templates for Cry8Ka1 model

building were found using a FASTA search of sequences in the Protein Data Bank [36] at the European Bioinformatics Institute <http://www.ebi.ac.uk/fasta33>.

After manual refinement of the sequence alignment, homology models of Cry8Ka1 (667 amino acid residues) and mutant Cry8Ka5 (649 amino acid residues) were created using MODELLER, Version 9.8 [37]. The Cry8Ea1 [16] (PDB entry 3EB7) toxin structures was used as template for construction of the structural model. In the final alignment, Cry8Ka1 shared 34.7% sequence identity with the template. Default regimes of model refinement by energy minimisation and simulated annealing were employed. Because of the low sequence similarity between target and template, a rigorous iterative modelling protocol was adopted in which 50 models were constructed and analysed. These models were analysed for packing and for stereochemical properties using PROCHECK [38]. Possible misalignments were highlighted by DOPE (Discrete Optimised Protein Energy; a statical potential used to assess homology models, running within the MODELLER environment) peaks, and variations in alignment of these regions were examined. When no further improvements could be achieved, the model with the best PROCHECK and DOPE scores was taken as the final model. Diagrammatic representations of the structures were generated using PyMOL 1.3 [39] (available at <http://www.pymol.org/>).

3. Results

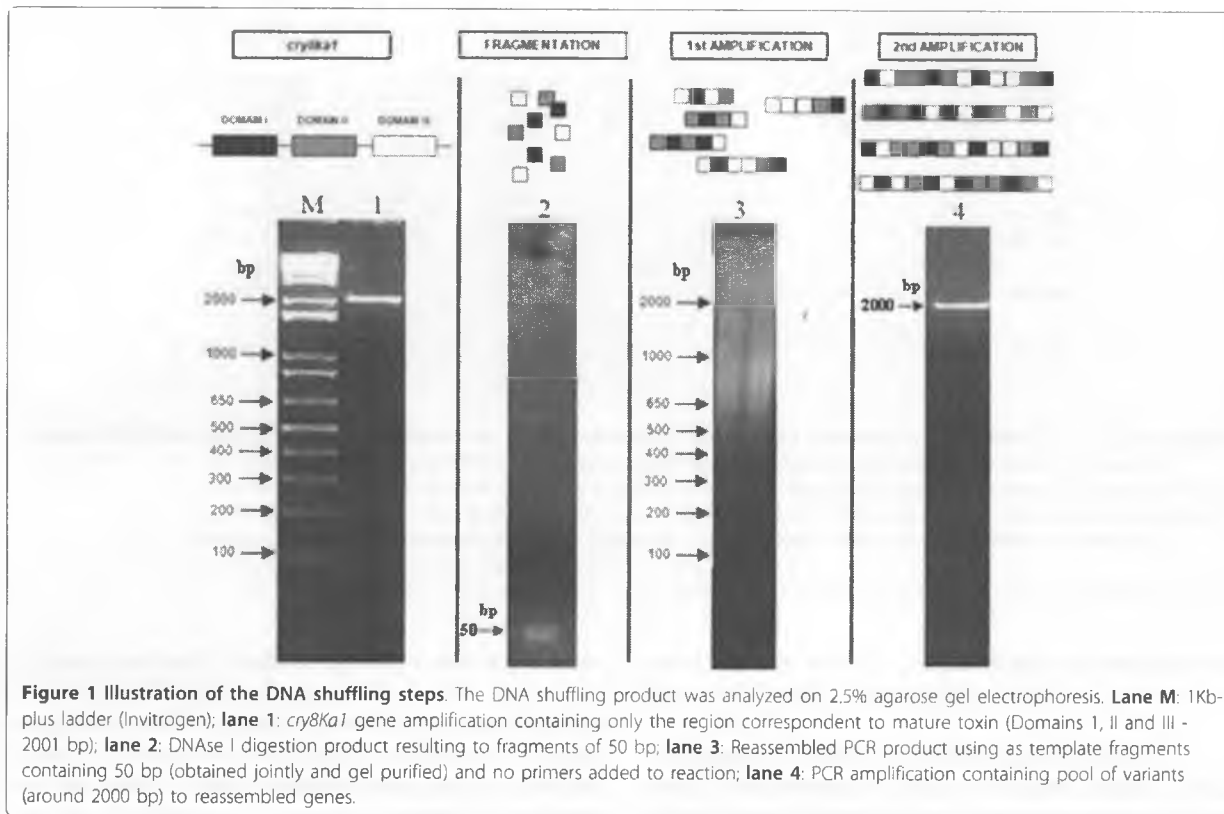
3.1 DNA shuffling and combinatorial library construction

To generate variants by applying the DNA shuffling procedure, the *cry8Ka1* nucleotide sequence (2001 bp) was PCR-amplified from the original vector and fragmented using DNase I. The resulting fragments in the 30-50 bp range were jointly purified and recombined to form reassembled genes using two consecutive PCR progressive programs. Using agarose gel electrophoresis, the DNA shuffling product was visualised as a single band of around 2000 bp that represented a population of *cry8Ka1* variant genes (Figure 1).

Both the DNA that contained the population of gene variants (DNA shuffling products) and also the PCR-amplified *cry8Ka1* gene were excised from gel, purified and then cloned into the pCOMB3X phagemid, resulting in pCOMB*cry8Ka1* and pCOMB*cry8Ka1*var constructs. The pCOMB*cry8Ka1*var construct was used to generate a combinatorial phage-display library of *cry8Ka1* variants containing 1.0×10^5 cfu/mL.

3.2 Screening of *cry8Ka1* combinatorial library towards BBMVs *A. grandis*

To select the clones expressing Cry8ka1 variants that bind specifically to the *A. grandis* midgut, the phage-



display combinatorial library was used for biopanning. Five selection rounds were performed. The fifth round was chosen because it yielded phage showing the highest binding specificity to *A. grandis* BBMV's (Figure 2). Two hundred randomly chosen clones from the fifth round exhibited amplicons corresponding to the original gene size of around 2000 bp (data not shown). The expression of the variant proteins was confirmed by dot blot detection of the haemagglutinin (HA) epitope fused to the variant proteins. A reaction signal was observed in the dot blot for most of the analysed clones (data not shown). Thirty clones that showed an expression signal in the dot blot analyses were randomly selected for further analysis of activity against *A. grandis*.

3.3. Evaluation of toxicity of the Cry variants in bioassays
 To assess the LC_{50} , neonate *A. grandis* larvae were incubated with purified Cry8Ka1 and Cry8Ka5 toxins expressed by the *E. coli* BL21 (DE3) strain (Figure 3).

Bioassays were conducted to evaluate the activity of Cry8Ka1 variants compared to the wild-type Cry8Ka1 toxin when incubated with neonate *A. grandis* larvae. The larvae mortality rate (Table 1) indicated no significant difference between treatment with a diet

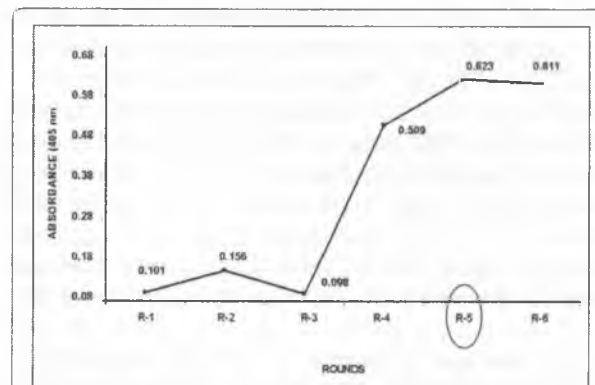
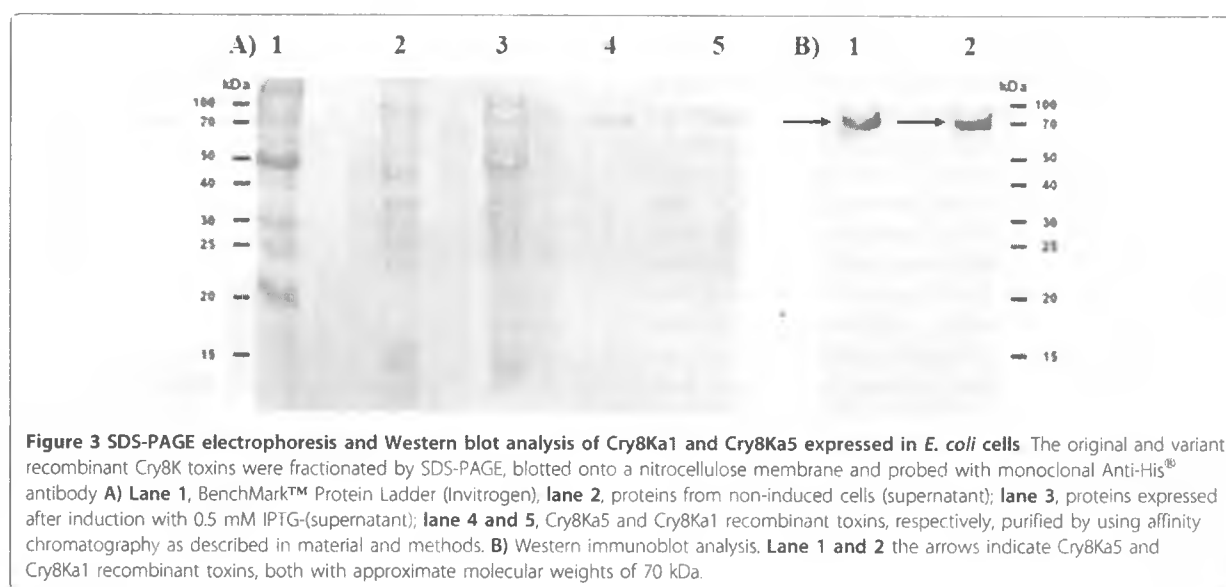


Figure 2 Biopanning screening of the *cry8ka1* Phage display combinatorial library for interactions of Cry8Ka1 variants with Brush Border Midgut Vesicles (BBMV's) from cotton boll weevil larvae (*A. grandis*). The absorbance indicated in the graph shows the phage-infected, which was related to the quantity of bacterial colonies obtained from each round of biopanning. Based in the data, the fifth round of biopanning was chosen as cycle of the enrichment of recombinant phages displaying Cry8Ka1 variants specifically bound to *A. grandis* BBMV's. The points of the curve indicate the absorbance at 405 nm (reading of phage) in each round.



supplemented with Cry8Ka1 protein, a diet supplemented with M13 helper phage or a diet with no protein supplementation (negative control) at the concentration tested. On the other hand, two (Cry8Ka3 and Cry8Ka5) out of the thirty Cry8Ka1 variants tested had a statistically significant effect on *A. grandis* compared to controls. The analysis of variance was significant for the mortality rates of these two variants. Based on these results, the Cry8Ka5 toxin was selected for additional characterisation (Figure 4A). The LC_{50} for the recombinant Cry8Ka5 protein was significantly lower (2.83 $\mu\text{g}/\text{mL}$) than that of Cry8Ka1 (8.93 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Figure 4B and 4C), indicating improved toxicity (three times higher) for the

novel toxin (Cry8Ka5) selected from the combinatorial library of Cry8Ka1 variants (Figure 4C).

3.4 Structural analysis of Cry8Ka1 variant toxins

Firstly, the presence of genetic variability in the *cry8Ka1* combinatorial library was determined using nucleotide sequence analysis (data not shown) of 30 clones isolated from the pool of variants that was obtained at the fifth round of biopanning, which was chosen as the cycle containing the highest enrichment of specific phage.

The selected *cry8Ka5* gene (1947 bp) encoded a protein of 649 amino acid residues. Sequence comparisons among the parental *cry8Ka1* gene (2001 bp) and the variant genes identified numerous nucleotide substitutions (Figure 5). However, most of these nucleotide substitutions were silent mutations. *In silico* amino acid sequence translation revealed just six changed residues that were located in positions distributed throughout the three typical domains of Cry toxins, using the Cry8Ka1 and Cry8Ka5 comparison as indicated (Figure 6). One substitution was observed in domain I (R82Q; within the $\alpha 3$ helix), two substitutions (Y260C and P321A) were observed in domain II and three substitutions (R508G, K538E and E594N) were observed in domain III. In addition to residue substitution, a deletion of 16 residues in the N-terminal part of the Cry8Ka5 protein was observed, and this deletion was responsible for the reduced size of the mutant as compared to Cry8Ka1 (not shown). Additional sequence analyses revealed that the five conserved blocks in the primary structure that were previously defined in typical Cry toxins [10,16,40] were retained in both the Cry8Ka1 parental molecule and the shuffled Cry8Ka5. According

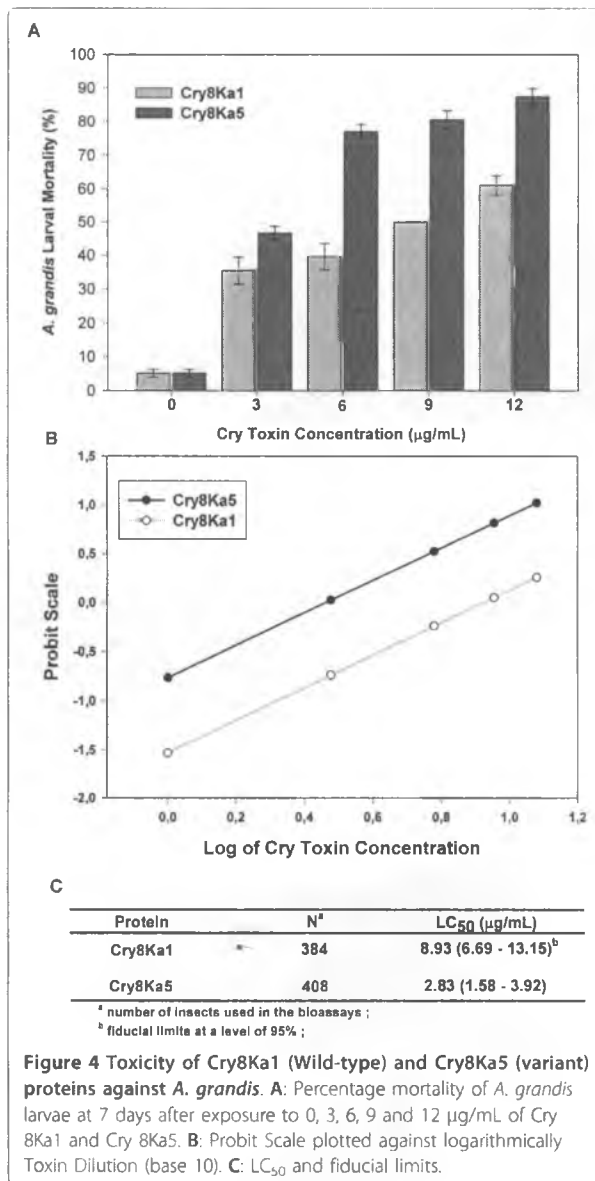
Table 1 Bioassay showing larvicidal activity including Cry8Ka1 toxin, the others toxins encoded by the seven selected gene variants and VCSM13 Phage (as negative control) using *A. grandis* larvae

Treatment	N	Lethality Mean (%) \pm SD	SEM
VCSM13 Phage (Control)	6	20.55 \pm 2.50 b ¹	1.02
Cry8Ka1 (Wild-type)	5	29.33 \pm 5.47 a,b	2.44
Cry8Ka2	5	36.66 \pm 5.77 a,b	2.58
Cry8Ka3	5	49.33 \pm 6.30 a	2.81
Cry8Ka4	6	33.88 \pm 11.95 a,b	4.88
Cry8Ka5	4	50.00 \pm 11.54 a	5.77
Cry8Ka6	6	32.77 \pm 15.22 a,b	6.21
Cry8Ka7	6	44.44 \pm 19.16 a,b	7.82
Cry8Ka8	5	45.99 \pm 17.50 a,b	7.82

10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of expressed phage were used in every treatment

N, number of bioassays (12 larvae/replicate); SD, standard deviation; SEM, Standard Error Mean.

¹ Results indicated with the same letter have no statistical difference between treatments ($p < 0.05$).



to multiple sequence alignments (Figure 7), the Cry8Ka toxins studied here had all of the highly conserved residues (highlighted in green colour) except for residue R, which was substituted to S in position 271. There seems to be no obvious functional consequence of this substitution.

In addition, molecular homology analyses performed using three-dimensional models constructed in this study showed identical folding to Cry8Ka5 such that Cry toxins were included in the group of three-domain Cry toxins. The structural alignments using Cry8Ka1 and Cry8Ka5 protein sequences indicated the three best results showing 34.7; 35.4 and 35.7% of identity with Cry8Ea1 (3EB7.pdb) [16], Cry3Aa (1DLC.pdb) [41] and

Cry3Bb1 (1J16.pdb) [42], respectively. Our proposed model for Cry8Ka toxins was obtained from structural alignments submitted to Modeller (as detailed in Materials and Methods) and is illustrated in Figure 6. The final Cry8Ka1 and Cry8Ka5 structural models were chosen based on similar and uniform distribution of amino acids in a Ramachandran plot (93% favourable residues, 6.2% residues in allowed locations; 0.8% unfavourable residues for Cry8Ka1 and 92.6% favourable residues, 6.6% residues in allowed locations; 0.8% unfavourable residues for the shuffled Cry8Ka5) and on DOPE analysis. The DOPE residue-by-residue energy profiles for the final models (not shown) suggested that the models were of high quality.

The Cry8Ka1 and Cry8Ka5 mutant models had the same backbone structure and differed only in the mutated side chains. Due to the very low sequence identity found in the N- and C-termini when compared to the template, these regions were not modelled. As shown in Figure 6, the Cry8Ka toxin model presents the three conserved domains (I, II and III) typical of Cry toxins. The positions of residues replaced in the shuffling process can be better seen in Figures 6b-d, in which the individual domain structures are illustrated. All mutations are localised at the surface and exposed to the solvent. In the Cry8Ka1 model, domain I consists of residues 1-238, domain II contains residues 239-450 and domain III includes residues 451-594.

4. Discussion

In this work, the *cry8Ka1* gene was used as a substrate for DNA shuffling. This gene was isolated from the *B. thuringiensis* S811 strain [25] and codes for a 668 residue protein with the conserved three domain structural architecture typical of Cry toxins. The Cry8Ka1 toxin has been shown to be moderately toxic to *A. grandis*, and our research focused on the molecular improvement of the Cry8Ka1 toxin. The challenge was to introduce changes in the primary structure and thereby achieve improved insecticidal activity.

The combined strategy using DNA shuffling and phage display techniques resulted in a combinatorial library containing 10⁵ variants. The efficiency of the DNA shuffling approach to improve specificity and to broaden the spectrum of insects controlled by Bt toxins was first mentioned in experiments using the *cry1Ca* gene. Screening of a *cry1Ca*-shuffled library for activity against *Spodoptera frugiperda* revealed a Bt toxin variant showing 3.8-fold higher LC₅₀ when compared to the wild-type. In other experiments, Cry1Ca variants tested against *S. exigua* showed 6.7-fold higher activity than wild-type Cry1Ca. In addition, the same variants were active against both *Heliothis zea* and *S. exigua* [20].

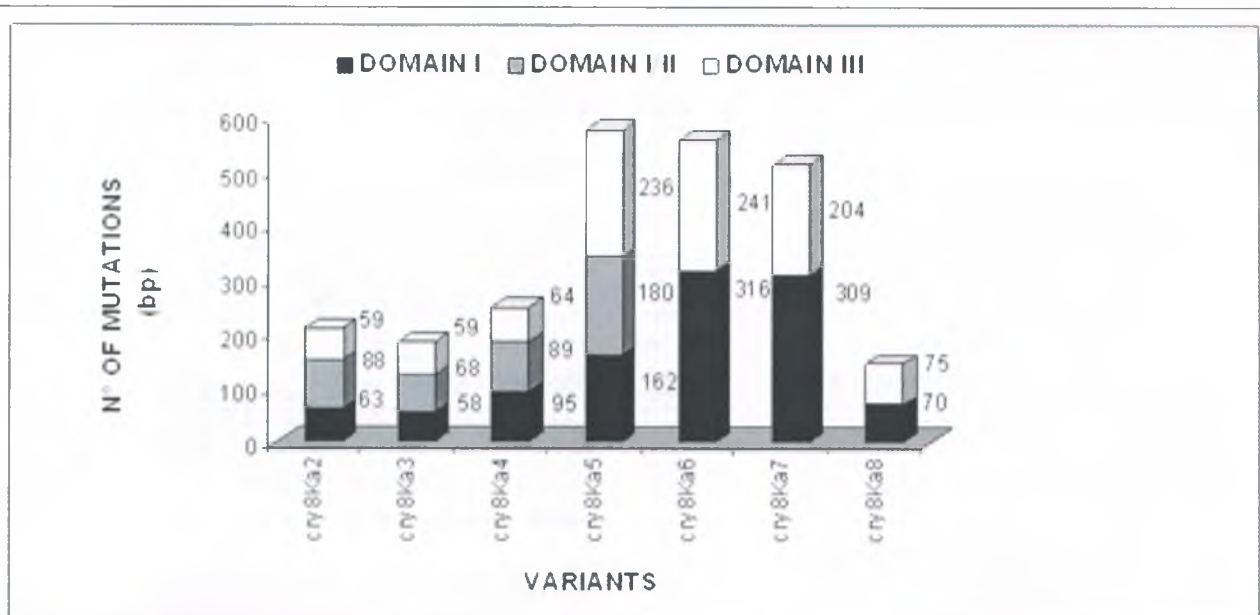


Figure 5 Graphic representation indicates number of substitutions in the nucleotide sequences, distributed among the three domains for that seven selected *cry8Ka1* variants. The sequences of variants named *cry8Ka2*, *cry8Ka3*, *cry8Ka4*, *cry8Ka5*, *cry8Ka6*, *cry8Ka7* and *cry8Ka8* were fully sequenced and aligned using *cry8Ka1*. In black color, indicate domain I, in gray color, domain II and white color, domain III. In each variant a large number of nucleotide mutations was observed. The *cry8Ka5* variant contained 578 nucleotide substitutions in total.

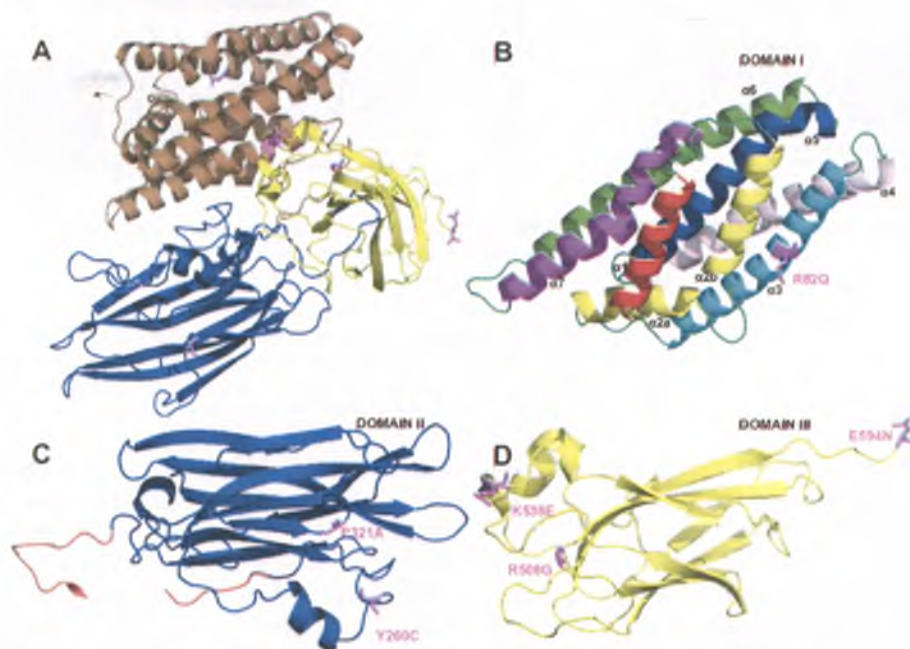


Figure 6 Ribbon diagrams of the Cry8Ka1 structural model produced with PyMOL [39] and indicating the positions of the amino acid substitutions obtained in Cry8Ka5 toxin. A: The whole molecule showing the three domains (Domain I in brown color, II in blue color and III in yellow color). Cry8Ka5 substituted residues are highlighted in magenta color. In B, Domain I, composed of eight α -helices, is shown. The position of the R82Q mutation is indicated on helix α 3 (also indicated in Fig 7). In C, the anti-parallel β -sheets of domain II, indicating two substituted residues in Cry8Ka5 toxin: Cys and Ala in positions 260 and 321, respectively. In D, the jelly-roll β -sheets of Domain III, and the three other mutated residues: Gly at position 508, Glu at 538 and Asn at 594.

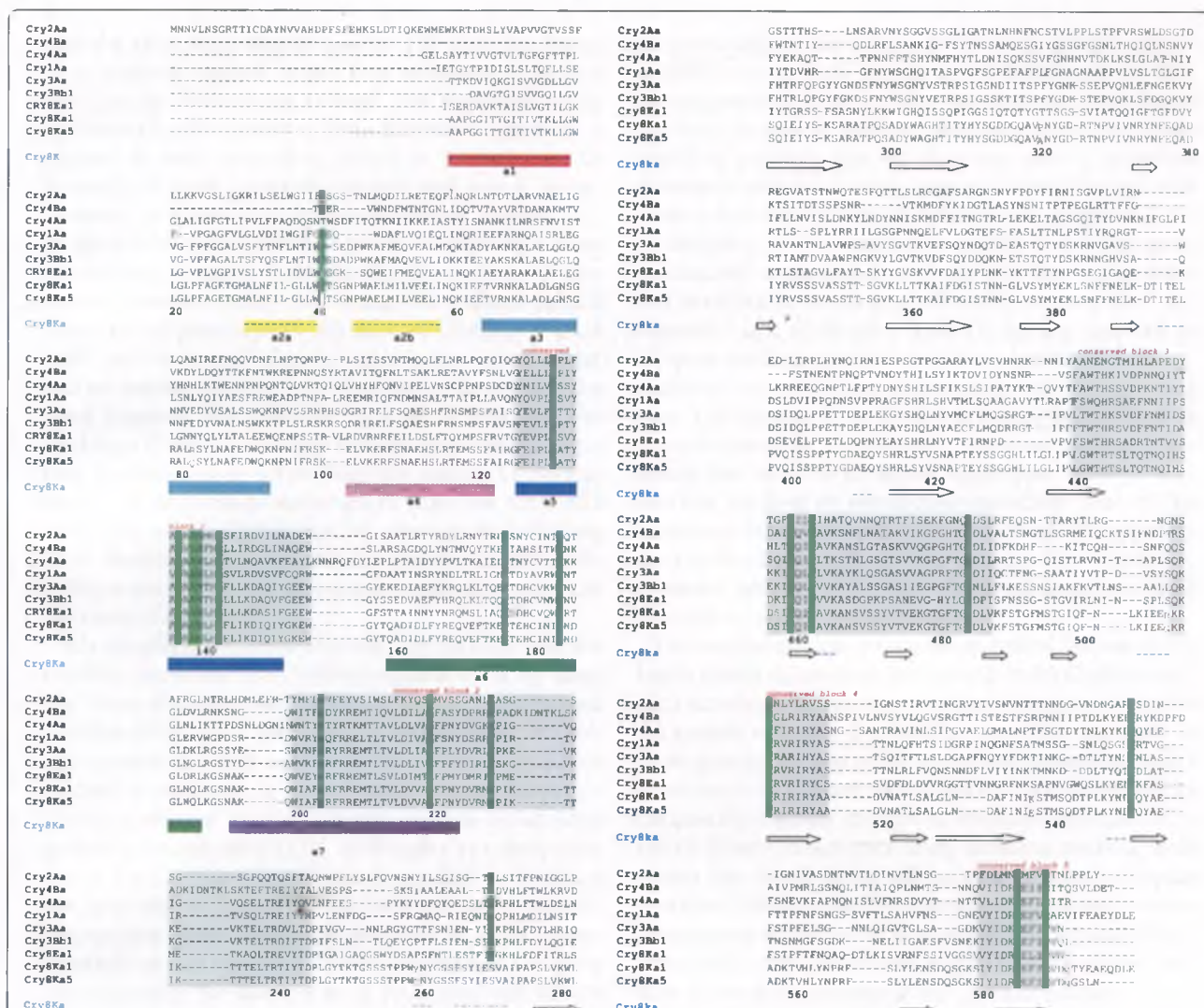


Figure 7 Multiple sequence alignment of activated Cry toxins after digestion (mature toxin) including translated Cry8Ka1 and mutant Cry8Ka5 sequences. From top to bottom the sequences are Cry2Aa (Uniprot code: P0A377), Cry4Ba (P05519), Cry4Aa (P16480), Cry1Aa (BAA04468), Cry 3Aa (P0A379), Cry3Bb1 (Q06117), Cry8Ea1 (NCBI accession: AAQ73470.1), Cry8Ka1 (FJ422558) e Cry8Ka5. The secondary structure of Cry8Ka1 is indicated in the bottom line. The Cry8Ka α -helix colors match up to the same α -helix colors presented in our homology model (Fig 6) constructed using Cry8Ea1 (PDB entry 3EB7) as template. The highly conserved boxes of Cry family are indicated by gray color and labeled in the top line. Highly conserved residues are highlighted in green. The five replaced residues in the Cry8Ka5 sequence comparing to Cry8Ka1 are highlighted in magenta. The numbers in the bottom line are those of the structural Cry8Ka1 model.

When screening genes for naturally occurring genetic variability or for artificially generated variability as performed in this study, the major concern is the choice of an optimal selection system that guarantees efficient screening of mutants containing the desired characteristics. The technique of displaying molecules on the phage surface [43-45] has been widely applied to select antibody chains, to identify receptor ligands, to define enzyme substrates, and to select anticoagulant activities and proteinase inhibitors [46-49]. In addition, phage display systems have proven to be a useful tool for studying toxins with binding domains such as Cry toxins

[24]. In the present study, we applied phage display methodology using M13 filamentous phage; we chose to couple this strategy to DNA shuffling because Cry toxins are AB-type toxins, which have been shown to be suitable targets for directed evolution [50,14]. As discussed in a previous study from our group [24], similar studies have encountered problems with the functionality of proteins displayed on M13 phage. In this study, the bioassays using Cry8ka5 recombinant protein confirmed the molecule's effectiveness and emphasised the need to establish better conditions that would overcome constraints to successfully express Cry protein variants

with the M13 phage display system. The mortality found from negative control in the first screening bioassays was due the M13 phage system. The bioassays using boll weevil artificial diet as here described represent a routine in our researches aimed to investigate the potential of novel molecules against boll weevil larvae. However, it is clear that for biotechnology purpose, e.g. production of insect-resistant plants, further tests must be conducted using boll weevils in presence of the genetic modified plants containing the selected variant genes. In the present work the selected Cry8Ka5 mutant toxin with improved activity against the insect target had six residue substitutions distributed throughout the three domains and a shorter N-terminal end than the wild-type Cry8Ka1. Because the selected mutant toxin was 3.1 times more active than the parental Cry8Ka1 toxin and 81.3 times more active than the Cry11a12 toxin [25], we concluded that the strategy of combining DNA shuffling and phage display was able to effectively select novel toxins that are more highly active against the cotton boll weevil.

We modelled the three-dimensional structures of the Cry8Ka1 toxin and the Cry8Ka5 mutant toxin by using the three-dimensional crystal structure of activated Cry8Ea1 (3EB7.pdb) toxin [16] as templates for homology modelling. Cry8 and Cry3-type toxins are active against a number of coleopteran pests; however, Cry8Ea1 showed specific toxicity against *Holotrichia parallela* (Scarabaeidae) [16]. Although Cry coleopteran toxins have not been as extensively studied as Cry1A, it has been shown that, as for Cry1A lepidopteran-specific toxins, the pore formation activity of Cry3 toxins depends on the formation of an oligomeric pre-pore structure after the interaction of protoxins with BBMV midgut cells from the Colorado potato beetle [51]. One previously reported theory is that the helix bundle in domain I is directly responsible for membrane penetration and pore formation after Cry toxins bind the specific receptors on the surface of the insect midgut [16]. In support of this theory, our Cry8Ka toxin models confirmed the presence of a seven-helix bundle, as has been generally described, and we also visualised the helix $\alpha 2$ separated in two helices (Figure 7), which is conserved among Cry toxin structures [16]. According to previous authors, the $\alpha 2$ helix break could be related to the mobility of the lid on the helix bundle during correct receptor recognition. At that moment, the lid comprising helix $\alpha 2b$ and loop $\alpha 2b$ - $\alpha 3$ must be removed from the top of the helix bundle to release the helical hairpin $\alpha 4$ - $\alpha 5$. Based on mutagenesis studies, the same authors discussed the significance of the conserved Pro-41 residue (residue number correspondent to primary structure of the Cry8Ka toxins - Figure 7) in maintaining the stability of Cry8Ea1. According to a more recent model

proposed for the initiation of Cry toxin domain disassembly, Pro-41 could be the key in facilitating the lid-opening starting from a stable conformation [16]. Based on these structural analyses, we suggest that the DNA shuffling strategy applied here was able to generate mutations without causing conformational changes that could affect the stability of a new toxin. Regarding the involvement of the domains II and III in the Cry toxin mechanism, a combination of site-directed mutagenesis and membrane binding studies [52] showed that the exposed loops of domain II on Cry3A are involved in receptor binding and that mutations can affect binding, resulting in increased or decreased toxicity. Loop 1 and loop 3 in domain II of Cry3A are directly involved in receptor binding. In addition, the same authors suggested that the loop III region might play a role in irreversible binding or membrane insertion. One of the mutations created by the cry8Ka1 gene shuffling procedure is localised in loop 3 of domain II in Cry8Ka5. However, neither of the two mutations in domain II of Cry8Ka5 is located in these loops.

Our results indicated that most structural features of the highly conserved residues are present in the Cry8Ka modelled structures. Given that our experiments to determine the specific receptors for Cry8Ka1 toxins are currently in development, the use of the molecular modelling results to explain how differences in toxicity could be caused by the specific residues changes is somewhat speculative. A cDNA library constructed using intestinal material from cotton boll weevil larvae will be used to screen receptor proteins. We hope that studies involving receptor-toxin interactions will allow us to elucidate the binding differences and increased toxicity related to the replaced residues in the three domains of the Cry8Ka5 mutant.

5. Conclusion

In conclusion, we have demonstrated that the strategy of combining DNA shuffling and phage display was able to effectively select novel toxins that are more highly active against the cotton boll weevil. With its improved toxicity against the cotton boll weevil, a major cotton insect-pest, the *cry8Ka5* gene has the potential to be used in plant transformation experiments to produce genetically modified cotton plants that are *A. grandis*-resistant. Our modelling studies show conservation of core residues in the Cry8Ka5 toxin structure, suggesting that the mutations altering activity should not affect molecular stability.

6. Acknowledgments

The present work was performed by grants from Brazilian government (CNPq, CAPES and EMBRAPA). The authors thank: Dr. Andréa Maranhão, (University of Brasília, Brazil) for kindly providing the pCOMB3X phagemid and support about phage display approaches.

with the M13 phage display system. The mortality found from negative control in the first screening bioassays was due the M13 phage system. The bioassays using boll weevil artificial diet as here described represent a routine in our researches aimed to investigate the potential of novel molecules against boll weevil larvae. However, it is clear that for biotechnology purpose, e.g. production of insect-resistant plants, further tests must be conducted using boll weevils in presence of the genetic modified plants containing the selected variant genes. In the present work the selected Cry8Ka5 mutant toxin with improved activity against the insect target had six residue substitutions distributed throughout the three domains and a shorter N-terminal end than the wild-type Cry8Ka1. Because the selected mutant toxin was 3.1 times more active than the parental Cry8Ka1 toxin and 81.3 times more active than the Cry11a12 toxin [25], we concluded that the strategy of combining DNA shuffling and phage display was able to effectively select novel toxins that are more highly active against the cotton boll weevil.

We modelled the three-dimensional structures of the Cry8Ka1 toxin and the Cry8Ka5 mutant toxin by using the three-dimensional crystal structure of activated Cry8Ea1 (3EB7.pdb) toxin [16] as templates for homology modelling. Cry8 and Cry3-type toxins are active against a number of coleopteran pests; however, Cry8Ea1 showed specific toxicity against *Holotrichia parallela* (Scarabaeidae) [16]. Although Cry coleopteran toxins have not been as extensively studied as Cry1A, it has been shown that, as for Cry1A lepidopteran-specific toxins, the pore formation activity of Cry3 toxins depends on the formation of an oligomeric pre-pore structure after the interaction of protoxins with BBMV midgut cells from the Colorado potato beetle [51]. One previously reported theory is that the helix bundle in domain I is directly responsible for membrane penetration and pore formation after Cry toxins bind the specific receptors on the surface of the insect midgut [16]. In support of this theory, our Cry8Ka toxin models confirmed the presence of a seven-helix bundle, as has been generally described, and we also visualised the helix $\alpha 2$ separated in two helices (Figure 7), which is conserved among Cry toxin structures [16]. According to previous authors, the $\alpha 2$ helix break could be related to the mobility of the lid on the helix bundle during correct receptor recognition. At that moment, the lid comprising helix $\alpha 2b$ and loop $\alpha 2b$ - $\alpha 3$ must be removed from the top of the helix bundle to release the helical hairpin $\alpha 4$ - $\alpha 5$. Based on mutagenesis studies, the same authors discussed the significance of the conserved Pro-41 residue (residue number correspondent to primary structure of the Cry8Ka toxins - Figure 7) in maintaining the stability of Cry8Ea1. According to a more recent model

proposed for the initiation of Cry toxin domain disassembly, Pro-41 could be the key in facilitating the lid-opening starting from a stable conformation [16]. Based on these structural analyses, we suggest that the DNA shuffling strategy applied here was able to generate mutations without causing conformational changes that could affect the stability of a new toxin. Regarding the involvement of the domains II and III in the Cry toxin mechanism, a combination of site-directed mutagenesis and membrane binding studies [52] showed that the exposed loops of domain II on Cry3A are involved in receptor binding and that mutations can affect binding, resulting in increased or decreased toxicity. Loop 1 and loop 3 in domain II of Cry3A are directly involved in receptor binding. In addition, the same authors suggested that the loop III region might play a role in irreversible binding or membrane insertion. One of the mutations created by the cry8Ka1 gene shuffling procedure is localised in loop 3 of domain II in Cry8Ka5. However, neither of the two mutations in domain II of Cry8Ka5 is located in these loops.

Our results indicated that most structural features of the highly conserved residues are present in the Cry8Ka modelled structures. Given that our experiments to determine the specific receptors for Cry8Ka1 toxins are currently in development, the use of the molecular modelling results to explain how differences in toxicity could be caused by the specific residues changes is somewhat speculative. A cDNA library constructed using intestinal material from cotton boll weevil larvae will be used to screen receptor proteins. We hope that studies involving receptor-toxin interactions will allow us to elucidate the binding differences and increased toxicity related to the replaced residues in the three domains of the Cry8Ka5 mutant.

5. Conclusion

In conclusion, we have demonstrated that the strategy of combining DNA shuffling and phage display was able to effectively select novel toxins that are more highly active against the cotton boll weevil. With its improved toxicity against the cotton boll weevil, a major cotton insect-pest, the *cry8Ka5* gene has the potential to be used in plant transformation experiments to produce genetically modified cotton plants that are *A. grandis*-resistant. Our modelling studies show conservation of core residues in the Cry8Ka5 toxin structure, suggesting that the mutations altering activity should not affect molecular stability.

6. Acknowledgments

The present work was performed by grants from Brazilian government (CNPq, CAPES and EMBRAPA). The authors thank: Dr. Andréa Maranhão, (University of Brasília, Brazil) for kindly providing the pCOMB3X phagemid and support about phage display approaches.

Author details

¹Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília - UnB, Brasília, DF, Brasil. ²Embrapa Algodão - Campina Grande, PB, Brasil. ³Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, PqEB- Final W5 Norte -Brasília, DF, Brasil. ⁴Institute of Integrative Biology, University of Liverpool, Liverpool, UK. ⁵Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. ⁶Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia - UCB, Brasília, DF, Brasil. ⁷Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos-UFPR, Curitiba, PR, Brasil.

Authors' contributions

GRO have carried out all experiments involving in vitro directed molecular evolution studies, and also carried out experiments aiming overexpression of recombinant proteins and its application into bioassays; MCMS carried out design and biopanning experiments, molecular modeling studies and involved in drafting the manuscript; WAL participated of constructions of structural models and drafted the manuscript; EYTN contributed to molecular characterization of the selected molecules; AAPF participated of sequence analysis, protein modeling, and have been involved in drafting the manuscript; MAB carried out the immunoassays; DSLS contributed to analysis and interpretation of data; JEGJ carried out BBMVs proteins preparation and participated to Phage display experiments; JDASJ participated in the design of the study, sequence analysis, vector construction for bacterial expression, drafting the manuscript and performed the statistical analysis DJR has been participated in the molecular structural studies and involved in revising of the manuscript critically; HBR participated of DNA shuffling experiments and bioassays; CRS coordinated studies and obtain recombinant protein expression; MFGS coordination of the research group carried out all design experiments and data analysis. All authors read and approved the final manuscript.

Received: 5 April 2011 Accepted: 9 September 2011

Published: 9 September 2011

References

- Silvie P, Leroy T: *Manual de identificação das pragas e seus danos no algodoeiro.Cascavel: COODETEC* 2001.
- Scataglini MA, Lanteri AA, Confalonieri VA: Diversity of boll weevil populations in South America: a phylogeographic approach. *Genetica* 2006, **126**:353-362.
- Martins WFS, Ayres GFJ, Lucena WA: Genetic diversity of Brazilian natural populations of *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae), the major cotton pest in the new World. *Genet Mol Res* 2007, **6**(1):23-32.
- Nakasu EYT, Firmino AAP, Dias SC, Rocha LT, Ramos HB, Oliveira GR, Lucena WA, Carlini CR, Grossi-de-Sa MF: Analysis of Cry8Ka5-binding proteins from *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae) midgut. *J Invertebr Pathol* 2010, **104**(3):227-230.
- Layton B: Boll weevil eradication effort.[http://deltafarmpress.com/boll-weevil-eradication-effort].
- Johnson J, Kiawu J, MacDonald S, Meyer L, Rosera E, Skelly C: THE UNITED STATES AND WORLD COTTON OUTLOOK.[http://www.usda.gov/oce/forum/2011_Speeches/2011-Cotton.pdf].
- James C: *Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops* Ithaca: ISAAA: Executive Summary; 2008.
- Bravo A, Soberón M: How to cope with insect resistance to Bt toxins? *Trends Biotechnol* 2008, **26**(10):573-579.
- James C: *Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops* Ithaca: ISAAA: Executive Summary; 2009.
- Höfte H, Whiteley HR: Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol Rev* 1989, **53**:242-255.
- Silva-Werneck JO, Ellar DJ: Characterization of a novel Cry9Bb d-endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. *J Invertebr Pathol* 2008, **98**:320-328.
- Pigott CR, Ellar DJ: Role of Receptors in *Bacillus thuringiensis* Crystal Toxin Activity. *Microbiol Mol Biol Rev* 2007, **71**:255-281.
- Soberón M, Pardo-López L, López I, Gómez I, Tabashnik BE, Bravo A: Engineering Modified Bt Toxins to Counter Insect Resistance. *Science* 2007, **e318**(5856):1640-1642.
- Fernández LE, Gómez I, Pacheco S, Arenas I, Gilia SS, Bravo A, Soberón M: Employing phage display to study the mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins. *Peptides* 2008, **29**:324-329.
- Zhang X, Candas M, Griko NB, Taussig R, Bulla LA Jr: A mechanism of cell death involving an adenyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Proc Natl Acad Sci* 2006, **103**:9897-9902.
- Guo SY, Ye S, Song FP, Zhang J, Wei L, Shu CL: Crystal structure of *Bacillus thuringiensis* Cry8Ea1: An insecticidal toxin toxic to underground pests, the larvae of *Holotrichia parallela*. *J Struct Biol* 2009, **168**:259-266.
- Broderick NA, Raffa KF, Handelsman J: Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. *Proc Natl Acad Sci* 2006, **103**:15196-15199.
- Stemmer WPC: Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Lett Nat* 1994, **370**:389-391.
- Zhao H, Arnold FH: Optimization for DNA shuffling for high fidelity recombination. *Nucleic Acids Res* 1997, **25**:1307-1308.
- Lassner M, Bedbrook J: Directed molecular evolution in plant improvement. *Curr Opin Plant Biol* 2001, **4**:152-156.
- Rosic NN, Huang W, Johnston WA, James J, Devos JJ, Gillam EMJ: Extending the diversity of cytochrome P450 enzymes by DNA family shuffling. *Gene* 2007, **395**:40-48.
- Grossi-de-Sa MF, Magalhães MTQ, Silva MS, Silva SMB, Dias SC, Nakasu EYT, Brunetta PSF, Oliveira GR, Oliveira-Nero OB, Oliveira RS, Soares LHB, Ayub MAZ, Siqueira HAA, Figueira ELZ: Susceptibility of *Anthonomus grandis* (Cotton Boll Weevil) and *Spodoptera frugiperda* (Fall Armyworm) to a Cry11a-type toxin from a Brazilian *Bacillus thuringiensis* strain. *J Biochem Mol Biol* 2007, **40**:773-782.
- Willats WGT: Phage display: practicalities and prospects. *Plant Mol Biol* 2002, **50**:837-854.
- Craveiro KIC, Gomes Júnior JE, Silva MCM, Macedo LLP, Lucena WA, Silva MS, Antonino de Souza JD Júnior, Oliveira GR, Magalhães MTQ, Santiago AD, Grossi-de-Sa MF: Variant Cry11a toxins generated by DNA shuffling are active against sugarcane giant borer. *J Biotechnol* 2010, **145**:215-221.
- Grossi-de-Sa MF, Oliveira GR, Silva MCM, Rocha TL, Magalhães MTQ: Molécula de ácido nucléico isolada, construção gênica, vetor, célula transgênica, método para obtenção de uma célula e de uma planta transgênica, polipeptídeo isolado e purificado, composição pesticida biodegradável, método para o controle de uma praga, método de obtenção de linhagens transgênicas resistentes a um inseto praga. *INPI Patent 012090001018* 2009.
- Wolfsberger M, Luethy P, Maurer A, Parenti P, Sacchi FV, Giordana B, Hanozet GM: Preparation and partial characterization of amino acid transporting brush border membrane vesicles from the larval midgut of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). *Comp Biochem Physiol* 1987, **86**:301-308.
- Bradford MM: A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* 1976, **72**:248-254.
- Andrés-Widhopf J, Rader C, Steinberger P, Fuller R, Barbas CF III: Methods for the generation of chicken monoclonal antibody fragments by phage display. *J Immunol Methods* 2000, **242**:159-181.
- Barbas CF III, Burton DR, Scott JK, Silverman GJ: *Phage Display: A Laboratory Manual* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2000.
- Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during assembly of head of Bacteriophage-T4. *Nature* 1970, **227**:680-685.
- Finney DJ: *Probit Analysis* Cambridge: Cambridge University Press; 1971.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Miller W, Lipman DJ: Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 1997, **25**:3389-3402.
- Staden R: The Staden Sequence Analysis Package. *Mol Biotechnol* 1996, **5**:233-241.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ: CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 1994, **22**:4673-4680.
- Edgar RC: MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 2004, **32**:1792-1797.
- Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, Shindyalov IN, Bourne PE: The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* 2000, **28**(1):235-242.
- Sali A, Blundell TL: Comparative Protein Modelling by Satisfaction of Spatial Restraints. *J Mol Biol* 1993, **234**:779-815.

38. Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS, Thornton JM: **PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures.** *J Appl Crystallogr* 1993, **26**:283-291.
39. **The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3.** Schrödinger, LLC.
40. Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, Zeigler DR, Dean DH: ***Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins.** *Microbiol Mol Biol Rev* 2008, **62**:775-806.
41. Li J, Carrol J, Ellar DJ: **Crystal structure of insecticidal α -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution.** *Nature* 1991, **353**:815-821.
42. Galitsky N, Cody V, Wojtczak A, Ghosh D, Luft JR, Pangborn W, English L: **Structure of the insecticidal bacterial delta-endotoxin Cry3Bb1 of *Bacillus thuringiensis*.** *Acta Crystallogr Sect D* 2001, **57**:1101-1109.
43. Kasman LM, Lukowiak AA, Garczynski SF, McNall RJ, Youngman P, Adang MJ: **Phage display of a biologically active *Bacillus thuringiensis* toxin.** *Appl Environ Microbiol* 1998, **64**:2995-3003.
44. Vilchez S, Jacoby J, Ellar DJ: **Display of Biologically Functional Insecticidal Toxin on the Surface of λ Phage.** *Appl Env Microbiol* 2004, **70**:6587-6594.
45. Pacheco S, Gómez I, Sato R, Bravo A, Soberón M: **Functional display of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin on T7 phage.** *J Invertebr Pathol* 2006, **92**:45-49.
46. Barbas CF III, Bain JD, Hoekstra DM, Lerner RA: **Semisynthetic combinatorial antibody libraries: A chemical solution to the diversity problem.** *Proc Natl Acad Sci* 1992, **89**:4457-4461.
47. Wang CI, Yang Q, Craik CS: **Isolation of a high affinity inhibitor of urokinase-type plasminogen activator by phage display of ecotin.** *J Biol Chem* 1995, **270**:12250-12256.
48. Kiczak L, Kasztura M, Koscielska-Kasprzak K, Dadlez M, Otlewski J: **Selection of potent chymotrypsin and elastase inhibitors from M13 phage library of basic pancreatic trypsin inhibitor (BPTI).** *Biochim Biophys Acta* 2001, **1550**:153-63.
49. Maun RH, Eigenbrot C, Lazarus RA: **Engineering Exosite Peptides for Complete Inhibition of Factor VIIa Using a Protease Switch with Substrate Phage.** *J Biol Chem* 2003, **278**:21823-21830.
50. Ishikawa H, Hoshino Y, Kawahara T, Kitajima M, Kitami M, Watanabe A, Bravo A, Soberon M, Honda A, Katsuro Yaoi K, Sato R: **A system for the directed evolution of the insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis*.** *Mol Biotechnol* 2007, **36**:90-101.
51. Rausell C, García-Robles I, Sánchez J, Muñoz-Garay C, Martínez-Ramírez AC, Real MD, Bravo A: **Role of toxin activation on binding and pore formation activity of the *Bacillus thuringiensis* Cry3 toxins in membranes of *Leptinotarsa decemlineata* (Say).** *Biochim Biophys Acta* 2004, **1660**:99-105.
52. Wu SJ, Koller CN, Miller DL, Bauer LS, Dean DH: **Enhanced toxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry3A delta-endotoxin in coleopterans by mutagenesis in a receptor binding loop.** *FEES Lett* 2000, **473**:227-232.

doi:10.1186/1472-6750-11-85

Cite this article as: Oliveira et al: Improving Cry8Ka toxin activity towards the cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*). *BMC Biotechnology* 2011 **11**:85.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

