

República Federativa do Brasil  
Ministério do Desenvolvimento, Indústria  
e do Comércio Exterior  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

**(21) PI 1102841-6 A2**



\* B R P I 1 1 0 2 8 4 1 A 2 \*

(22) Data de Depósito: 08/06/2011

(43) Data da Publicação: 16/07/2013

(RPI 2219)

**(51) Int.Cl.:**

C12N 15/29

C12N 15/82

C07K 14/415

C12N 5/10

A01H 5/00

A01N 63/02

A01P 7/04

**(54) Título:** MUTANTES DE INIBIDORES DE ALFA AMILASES ISOLADOS DE PHASEOLUS VULGARIS COM PROPRIEDADES DE CONTROLAR INSETOS-PRAGA, COMPOSIÇÕES CONTENDO TAIS MUTANTES E MÉTODO DE UTILIZAÇÃO DOS MESMO

**(73) Titular(es):** Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-Embrapa

**(72) Inventor(es):** Maria Cristina Mattar da Silva, Maria Fátima Grossi de Sa, Rafael Perseguini Del Sarto, Thales Lima Rocha

**(57) Resumo:** MUTANTES DE INIBIDORES DE ALFA AMÍLASES ISOLADOS DE *Phaseolus vulgaris* COM PROPRIEDADES DE CONTROLAR INSETOS-PRAGA, COMPOSIÇÕES CONTENDO TAIS MUTANTES E MÉTODO DE UTILIZAÇÃO DOS MESMOS. A presente invenção refere-se ao campo de controle de insetos-praga, utilizando métodos e composições que compreendem análogos mutantes de inibidores de alfa-amilases ( $\alpha$ Als). Mais especificamente a invenção fornece novas moléculas análogas de mutantes dos  $\alpha$ Als para o controle de insetos-praga, particularmente o bicudo-do-algodoeiro (*Arhonomus grandis*), apresentando redução parcial ou total da atividade amilolítica de enzimas digestivas presentes no lúmen intestinal do inseto. São também aspectos da invenção, construções gênicas contendo as moléculas de ácido nucleico, codificantes para os inibidores de alfa-amilases, métodos para a expressão heteróloga das novas moléculas na forma ativa, bem como o uso das mesmas no controle de insetos-praga. A invenção também fornece genes análogos sintéticos, os quais são otimizados para transformação e expressão dos mesmos em plantas.

**“MUTANTES DE INIBIDORES DE ALFA AMILASES ISOLADOS DE *Phaseolus vulgaris* COM PROPRIEDADES DE CONTROLAR INSETOS-PRAGA, COMPOSIÇÕES CONTENDO TAIS MUTANTES E MÉTODO DE UTILIZAÇÃO DOS MESMOS”**

5 **CAMPO DA INVENÇÃO**

A presente invenção refere-se ao campo de controle de insetos-praga, utilizando métodos e composições que compreendem análogos mutantes de inibidores de alfa-amilases ( $\alpha$ AIs). Mais especificamente a invenção fornece novas moléculas análogas de mutantes dos  $\alpha$ AIs para o controle de insetos-praga, particularmente o bicudo-do-  
10 algodoeiro (*Anthonomus grandis*), apresentando redução parcial ou total da atividade amilolítica de enzimas digestivas presentes no lúmen intestinal do inseto. São também aspectos da invenção, construções gênicas contendo as moléculas de ácido nucleico, codificantes para os inibidores de alfa-amilases, métodos para a expressão heteróloga das novas moléculas na forma ativa, bem como o uso das mesmas no controle de insetos-praga.  
15 A invenção também fornece genes análogos sintéticos os quais são otimizados para transformação e expressão dos mesmos em plantas.

**FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO**

O ataque de insetos-praga é o principal fator nas perdas de produção de importantes espécies da agricultura mundial. Por exemplo, os danos causados exclusivamente pelo  
20 ataque do bicudo do algodoeiro podem ser economicamente devastadores para os produtores de algodão, nos países onde o inseto existe, chegando a atingir a cifra de milhões.

Os métodos tradicionais para o controle de populações de insetos-praga são rotação de culturas e aplicação de pesticidas químicos e sintéticos em grande escala. Entretanto, o  
25 governo e consumidores tem enfaticamente alertado para prejuízos ambientais e de saúde,

associados ao uso de pesticidas químicos. As normas para produção e o uso destes agentes químicos estão contidas em legislações que visam a restrição do uso e punição dos usuários. Assim, o desenvolvimento de alternativas para o uso de pesticidas químicos é de grande interesse. O controle biológico para o controle de insetos-praga de significância para agricultura, tais como fungo, bactérias e outras espécies de insetos, embora seja uma alternativa amigável e comercialmente atraente, nem sempre apresenta a eficiência desejada.

O algodoeiro é uma cultura hospedeira de um grande número de insetos, sendo que pelo menos 20 espécies apresentam potencial de causar danos (Papa, G. In Algodão: Pesquisas e Resultado para o campo v.01, 2006). Dentre os principais insetos-praga, destaca-se o bicudo-do-algodoeiro, *Anthonomus grandis* (Boheman, C. H. Description of new species. In Schoenherr, Genera et species *Curculionidum cum synonymia hujus* Familiae, vol. 7, pt. 2. Paris: Roret. 461p., 1843), considerado uma das pragas mais sérias da cultura do algodão, encontrando-se dispersa no México, Cuba, Haiti, Venezuela, Colômbia, Paraguai e Brasil. Este inseto utiliza os botões florais e frutos do seu hospedeiro como fonte de alimento e local de desenvolvimento, causando prejuízos diretos à comercialização da fibra de algodão. Os níveis de infestação crescem rapidamente e os prejuízos podem atingir até 100% da produção, caso as medidas de controle não sejam adequadas. Representa um grande potencial de dano, sendo considerado praga-chave no planejamento e controle dos insetos nocivos à cultura, principalmente devido à dificuldade de controle pelos inseticidas químicos.

A planta de algodão e os insetos-praga da cultura coexistem por um longo período evolutivo. Planta e inseto formam um sistema morfológico e bioquímico interdependente e competitivo, resultando na maioria das vezes, na utilização de parte da planta pelo inseto. Essa parte utilizada é o dano causado pelo inseto à planta, e depende do tamanho da população da praga, e da habilidade da planta de resistir ao ataque e de se recuperar do dano sofrido (Beltrão, E. M., Souza, J. G. O agronegócio do algodão no Brasil. Embrapa: Brasília, v.01, 1999).

A interação planta versus inseto pode ser visualizada sob dois aspectos: do ponto de vista do inseto, com a planta variando de adequada a completamente inadequada como hospedeira e, por outro lado, do ponto de vista da planta onde, quanto menor o número de espécies e abundância de insetos associados a estas e quanto menor o efeito que esses insetos exercem sobre elas, maior a sua resistência sobre esses insetos (Santos, W. J. Identificação, biologia, amostragem e controle das pragas do algodoeiro. In: Embrapa Agropecuária Oeste; Embrapa Algodão. Algodão: tecnologia de produção., p. 296p. 2002).

Entre um extremo e outro de resistência das plantas aos insetos-praga, existe um completo e extensivo arsenal de mecanismos de ataque e contra-ataque a ação dos insetos, que vão desde um simples impedimento morfológico a complexos componentes fitoquímicos, que interferem diretamente no processo metabólico envolvido na utilização da planta como hospedeira do inseto. Em termos práticos, a resistência do algodoeiro aos insetos-praga representa a habilidade de certas cultivares produzirem algodão de melhor qualidade em maior quantidade que outros cultivares, sob ataque da mesma população de insetos-praga (Freire, E. C. Cultivares e produção de semente na melhoria da qualidade do algodão no nordeste e centro-oeste do Brasil. Boletim informativo Embrapa/ CNPA. 1997).

Na maioria dos países onde o algodão é cultivado, a vulnerabilidade dos insetos-praga representa o principal problema desta cultura. Sem alternativas de controle mais eficazes, os produtores, de forma rotineira, continuam acreditando que os inseticidas químicos sejam a única forma de proteção das lavouras. Embora eficientes, são onerosos, potencialmente danosos ao homem, ao meio ambiente e, em longo prazo, ocasionam o desencadeamento de processos de resistência, ressurgimento de pragas e redução na incidência de inimigos naturais (Panizzi, A. R. Efeito de inseticidas na população das principais pragas da soja. An. Soc. Entomol. Brasil, v.6, p.264-275. 1977).

A introdução estável de genes exógenos em plantas de algodão, com a finalidade de induzir defesa da planta a insetos-praga é considerada uma alternativa para a diminuição de grande parte dos problemas associados aos métodos químicos. Esta tecnologia reúne várias vantagens, incluindo o fator não poluição do ambiente. Diferentes relatos mostram plantas transformadas geneticamente modificadas com inibidores proteicos, não tendo sido

observados efeitos negativos sobre o ambiente, e sendo as características herdáveis e expressas normalmente na planta (Carpenter, J. Peer reviewed surveys indicate positive impact of commercialized GM crops. *Nature Biotechnology*. 28:319-321, 2010; Quirino, B.; In *Revolução dos transgênicos*. Editora Interciência Ltda. 2008; Kluh, I.; Horn, M.; Hýblová, J.; Hubert, J.; Maresová, L.D.; Voburka, Z.; Kudliková, I.; Kocourek, F.; Mares, M.; Inhibitory specificity and insecticidal selectivity of  $\alpha$ -amylase inhibitor from *Phaseolus vulgaris*. *Phytochemistry*, 66:31-39. 2005; Schuler, T.; Poppy, G.M.; Kerry, B.R.; Denholm, I. Insect Resistant Transgenic Plants. *Trends in Biotechnology*, 16:168-175. 1998).

A utilização de inibidores protéicos encontrados na natureza com aplicação biotecnológica é muito vasta, e os mesmos representam importante matéria-prima para o desenvolvimento de novos produtos, com função, por exemplo, de inativar enzimas do intestino dos insetos em amplo espectro de ação. Dentre os inibidores protéicos, uma grande descoberta foi o inibidor de alfa-amilase ( $\alpha$ AI). Este tipo de inibidor pode ser isolado de diferentes fontes. O inibidor de alfa-amilase encontrado em feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) tem grande potencial para uso na transgenia visando à proteção de plantas contra o ataque de insetos, principalmente os coleópteros da ordem Bruchidae (Morton, R. L.; Shoroeder, H. E.; Bateman, K.S.; Chrispeels, M. J.; Armstrong, E.; Higgins, T. J. (2000) Bean alpha-amylase inhibitor 1 in transgenic peas (*Pisum sativum*) provides complete protection from pea weevil (*Bruchus pisorium*) under field conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 3820-3825, 2000). Embora os grãos de feijão comum possuam pelo menos três isoformas de ( $\alpha$ AI), denominadas isoforma 1 ( $\alpha$ AI-1); isoforma 2 ( $\alpha$ AI-2) e uma forma precursora ( $\alpha$ AIL), as isoformas  $\alpha$ AI-1 e  $\alpha$ AI-2 são muito estudadas e indicadas como fonte de moléculas potenciais para programas biotecnológicos, destinados à obtenção de plantas transgênicas resistentes à insetos-praga. Com esta estratégia é possível reduzir em níveis toleráveis as populações de insetos-praga agrícolas de interesse econômico. Em geral o inibidor  $\alpha$ AI-1 é encontrado em acessos de feijão distribuídos no mundo todo (Iguti, A. M.; Lajolo, F. M. Isolation and Purification of Amylase Inhibitors from Beans. In: PAABS - The Pan-American Association of Biochemical Societies - VI Congress. São Paulo, 1990,

São Paulo. PAABS - The Pan-American Association of Biochemical Societies - VI Congress, 1990; Suzuki K, Ishimoto M, Kitamura K. ADNc sequence and deduced primary structure of an alpha-amylase inhibitor from a bruchid-resistant wild common bean. *Biochim Biophys Acta*.1206:289-291.1994.; Suzuki K., Ishimoto M., Kikuchi F.,  
5 Kitamura K. Growth inhibitory effect of an  $\alpha$ -amylase inhibitor from the wild common bean resistant to the Mexican bean weevil (*Zabrotes subfasciatus*). *Jpn J Breed* 43:257–265, 1993.; Ishimoto, M., Sato, T., Chrispeels, M.J.; Kitamura, K. Bruchid resistance of transgenic azuki bean expressing seed  $\alpha$ -amylase inhibitor of common bean. *Entomol. Exp. Appl.*, 79, 309-315.1996). A proteína se acumula nas sementes representando 9-11% da  
10 proteína total das sementes (Moreno, J.; Chrispeels, M.J. *A Lectin gene encodes the alpha-amylase inhibitor of the common bean*. *Proceeding of the National Academy Science* 86:7885-7889, 1989), podendo variar de acordo com limitações de métodos de extração. Os inibidores  $\alpha$ AI-1 e  $\alpha$ AI-2 são classificados na família de lectinas, sendo a estrutura da molécula nativa apresentada na forma tetramérica ( $\alpha_2\beta_2$ ), constituída de duas subunidades  $\alpha$   
15 e duas subunidades  $\beta$ . O inibidor é sintetizado no retículo endoplasmático, modificado no aparelho de golgi pela remoção do peptídeo sinal, glicosilado e transportado para os vacúolos de reserva, onde sofre processamento proteolítico para se tornar uma molécula ativa (Moreno, J.; Chrispeels, M.J. *A Lectin gene encodes the alpha-amylase inhibitor of the common bean*. *Proceeding of the National Academy Science* 86:7885-7889, 1989;  
20 Moreno, J.; Altabella T.; Chrispeels, M. J. Characterization of alpha-amylase-inhibitor, a lectin-like protein in the seeds of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiology* 92 703-709.1990.; Pueyo, J. J.; Hunt, D. C.; Chrispeels, J.M. Activation of bean (*P. vulgaris*) alpha amylase inhibitors requires proteolytic processing of the preprotein. *Plant Physiology*, 101:1341-1348, 1993; Young, N.M.; Thibault, P., Watson, D.C.; Chrispeels, M.J. Post translational  
25 processing of two alpha-amylase inhibitors and an arcelin from the common bean, *P. vulgaris*. *FEBS Letters*, 5: 203-20, 1999). Estes inibidores apresentam amplo espectro de ação envolvendo questões de especificidade. Enquanto o  $\alpha$ AI-1 inibe alfa-amilases de mamíferos e fortemente as alfa-amilases de alguns insetos, como as brocas: do feijão de corda (*Callosobruchus maculatus*) e do feijão azuki (*C. chinensis*); da ervilha (*Bruchus*

- pisorium*) (Franco, O.L.; Rigden, D.J.; Melo, F.R.; Grossi-De-Sá, M.F. Plant alpha-amylase inhibitors and their interaction with insect alpha-amylases. European Journal of Biochemistry, 269: 397-412, 2002) e do café (*Hypothenemus hampei*) (Valencia, A.; Bustillo, A. E.; Ossa, G. E.; Chrispeels, J.M. Alpha-amylase of coffee Berry borer (*Hypothenemus hampei*) and their inhibition by two plant amylase inhibitors. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 30:207-213, 2000), a forma  $\alpha$ AI-2, encontrada apenas em acessos não comercializados de feijão, somente inibe fortemente a alfa-amilase do bruquídeo *Z. subfasciatus* (importante praga do feijão comum) e não inibe a alfa-amilase pancreática de porco (PPA) (Grossi de Sá, M.F., Mirkov, T.E., Ishimoto, M., Colucci, G., Bateman, K.S., Chrispeels, M.J. Molecular Characterization of a bean alpha-amylase inhibitor that inhibits alpha-amylase of the Mexican bean weevil *Z. subfasciatus*. Planta. 203:295-303, 1997; Silva, M.C.M.; Mello, L.V.; Coutinho, M.V.; Rigden, D.J.; Neshich, G.; Chrispeels, M.J.; Grossi-de-Sá, M.F. Mutants of common bean alpha-amylase inhibitor-2 as an approach to investigate binding specificity to alpha-amylases. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 39:201-208). Testados contra *A. grandis*, os inibidores originais  $\alpha$ AI-1 e  $\alpha$ AI-2, que possuem entre si 78% de identidade de seqüência de aminoácidos, não apresentam atividade anti-amilásica (Oliveira-Neto OB, Batista JA, Rigden DJ, Franco OL, Falcão R, Fragoso RR, Mello LV, dos Santos RC, Grossi-de-Sá MF. Molecular cloning of alpha-amylases from cotton boll weevil, *Anthonomus grandis* and structural relation to plant inhibitor: an approach to insect plant resistance. Journal Protein Chemistry. 2003 22:77-87, 2003). Além disto, estes inibidores não têm atividade contra as amilases endógenas das plantas (Moreno, J.; Chrispeels, M.J. A *Lectin gene encodes the alpha-amylase inhibitor of the common bean*. Proceeding of the National Academy Science 86:7885-7889, 1989).
- 25 Alfa-amilases ( $\alpha$ -1,4-glucan-4- glucanohidrolase, EC 3.2.1.1 – <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/rules.html>) são enzimas de um grupo largamente distribuído em secreções de microorganismos, animais e plantas e que catalisam, principalmente, a hidrólise de ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4, em amido, glicogênio e vários oligossacarídeos (Svensson, B. Protein engineering in the alpha-amylase family: catalytic

mechanism, substrate specificity and stability, *Plant Molecular Biology* 25:141-157,1994). Outras alfa-amilases podem quebrar exclusivamente ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,6 ou  $\alpha$ -1,4/ $\alpha$ -1,6, outras podem clivar resíduos de sacarose, e outras ainda podem hidrolisar uma forma de glicose ligada a trealose (MacGregor, E.A. Alpha-amylase structure and activity. *J. Protein Chem* 7:399-415,1988.) clivagem do amido pelas alfa-amilases constitui o primeiro passo da degradação enzimática de polissacarídeos que é essencial na assimilação de carboidratos. Nos insetos, o bloqueio da atividade amilolítica por inibidores causa redução na assimilação de carboidratos provocando a diminuição do crescimento larval, prejudicando todo o ciclo de vida, podendo levar a morte, por inanição (Oliveira-Neto, O. B.; Batista, J. A. N.; Ridgen, D. J.; Franco, O. L.; Falcão, R. ; Fragoso, R.R.; Mello, L. V.; Santos, R. C.; Grossi-de Sá, M.F. Molecular cloning of  $\alpha$ -amylases from cotton boll weevil, *A. grandis* and structural relations of plant inhibitors: an approach to insect resistance. *Journal of Protein Chemistry*, 22:77-87, 2003. Kluh, I.; Horn, M.;Hýblová, J.; Hubert,J.; Maresová, L.D.; Voburka, Z.;Kudliková, I.; Kocourek, F.; Mares, M.; Inhibitory specificity and insecticidal selectivity of  $\alpha$ -amylase inhibitor from *Phaseolus vulgaris*. *Phytochemistry*, 66:31-39. 2005).

Vários inibidores de alfa-amilases tiveram sua estrutura tridimensional determinada, de forma isolada ou em complexo com alfa-amilases, por exemplo, o inibidor de *Amaranthus hypochondriacus* (Lu, S., Deng, P., Liu, X., Luo, J., Han, R., Gu, X., Liang, S., Wang, X., Li, F., Lozanov, V., Patthy, A., Pongor, S., Solution structure of the major alpha-amylase inhibitor of the crop plant amaranth. *Journal of Biological Chemistry*, 274:20473-20478. 1999.; Martins, J.C.; Enassar, M.; Willem, R.; Wieruzeski, J.M.; Lippens, G.; Wodak, S.J. Solution structure of the main alpha-amylase inhibitor from amaranth seeds. *European Journal of Biochemistry*, 268:2379-2389. 2001.) e o inibidor isolado de centeio (Iulek, J., Franco, O.L., Silva, M., Slivinski, C.T., Bloch, C., Jr., Rigden, D.J., Grossi-de-Sá, M.F. Purification, biochemical characterisation and partial primary structure of a new alpha-amylase inhibitor from *Secale cereale* (rye) *Int. J. Bio-chem. Cel. Biol* 32: 1195-1204. 2000). O inibidor  $\alpha$ AI-1 de *P. vulgaris* teve sua estrutura atômica determinada em complexo com alfa-amilase de mamífero (PPA) e com a alfa-amilase da lagarta (*Tenebrio molitor*) (Nahoum V, Farisei F, Le-Berre-Anton V, Egloff MP, Rougé P, Poerio E, Payan F. A plant seed

inhibitor of two classes of alpha-amylase in complex with the bean *P. vulgaris* inhibitor. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 55:360-362. 1999). A formação dos complexos enzima-inibidor, no caso do  $\alpha$ AI-1 é totalmente dependente da concentração proteica, temperatura e pH (Grossi de Sá, M.F., Mirkov, T.E., Ishimoto, M., Colucci, G., Bateman, K.S., Chrispeels, M.J. Molecular Characterization of a bean alpha-amylase inhibitor that inhibits alpha-amylase of the Mexican bean weevil *Z. subfasciatus*. Planta. 203:295-303, 1997).

Introdução de um gene codificando para o inibidor  $\alpha$ AI-1 tem conferido resistência para vários insetos bruquídeos quando expressados em sementes de ervilhas (*Pisum sativum* L.) transgênicas (Shade, R.E., Schroeder, R.E., Pueyo, J.J., Tabe, L. M., Murdock, L. I., Higgins, T.J.V., Chrispeels, J. M. Transgenic pea seeds expressing the  $\alpha$ -amylase inhibitor of the common bean are resistant to bruchid beetles. Biotechnology 12:793-796, 1994; Schroeder, R.E., Gollash, S., Moore, A. Bean  $\alpha$ -amylase inhibitor confers resistance to the pea weevil (*Bruchus pisorium*) in transgenic peas (*Pisum sativum* L.). Plant Physiology 107:1233-1239, 1995.); Morton, R.I., Schroeder, R.E., Bateman, K.S., Chrispeels, J.M.; Armstrong, E., Higgins, T. J.V. Bean  $\alpha$ -amylase inhibitor 1 in transgenic peas (*Pisum sativum* L.) provides complete protection from pea weevil (*Bruchus pisorium*) under field conditions. Proc. Nac. Acad. Sci. USA 97:3820-3835, 2000; Sousa-majer, M.J.D., Hardei, D.C.; Turner, N.C., Higgins, T. J.V. (2007) Bean  $\alpha$ -amylase inhibitors in transgenic peas inhibit development of pea weevil larvae. J. Econ, Entomol. 100:1416-1422) em feijão azuki (Ishimoto, M., Sato, T., Chrispeels, M. J., Kitamura, K. (1996) Bruchis resistance of transgenic azuki bean expressing seeds  $\alpha$ -amylase inhibitor of the common bean. Entomol. Exp. Appl. 79:309-315) em grão de bico (*Cicer arietinum*) (Sarmah, B.K., Moore, A., Tate, W., Molvig, L., Morton, R.L., Rees, D.P., Chiasise, P., Chrispeels, J.M., Tae, L.M., Higgins, T.J.V. (2004) Transgenic chickpea seeds expressing high levels of a bean  $\alpha$ -amylase inhibitor. Mol. Breed 14:73-82.; Ignacimuthu, S. Prakash, S. (2006) Agrobacterium-mediated transformation of chickpea with  $\alpha$ -amylase inhibitor gene for insect resistance. J. Biosci 31:339-345; em plantas de *Vigna radiata* L. (Sonia, R.S., Singh, R. P., Jaiwal, P.K. (2007) *Agrobacterium tumefaciens* mediated transfer of *Phaseolus vulgaris* ; *V. unguiculata*  $\alpha$ -amylase inhibitor-1 gene into mungbean *Vigna radiata* (L.) Wilezek using bar as selectable

marker (2007) Plant Cell Report 26:187-198, em sementes de feijão caupi (*Vigna unguiculata*) (Solleti, S. K., Bakshi, S., Purkayastha, J., Panda, S. K., Shoo, L. Transgenic cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds expressing a bean  $\alpha$ -amylase inhibitor 1 confer resistance to storage pests, bruchid beetles. Plant Cell Report 27: 1841-1850. 2008

5 O uso de genes codificantes para estes tipos de proteínas e a expressão das mesmas em sistemas heterólogos (plantas transgênicas) contorna as dificuldades geradas pelo uso dos bioinseticidas ou inseticidas químicos. No entanto, até o momento, existe apenas um relato da utilização de inibidor proteico na produção de algodão transgênico para o controle de inseto (*cpTi* – que codifica para um inibidor de tripsina e quimotripsina, utilizado pelo  
10 setor público da China (Shirong, J In Transgenic Cotton – Chapter 7 – Bt/CpTI Insect Resistant Cotton, Science Press Beijing/New York, 2004).

Atualmente, as plantas transgênicas expressando genes  $\alpha AIs$  do tipo isolado de feijão comum pertencem a família das leguminosas (feijão, ervilha, grão de bico) e em planta café arábica (família rubiácea). Sendo assim, até a presente data nenhuma invenção descreveu um  
15 gene, desta natureza, com potencial aplicação em planta de algodão (família Malvacea). Na presente invenção foi construída uma biblioteca combinatória, aplicando a técnica de *Embaralhamento de ADN* (Stemmer, W.P.C., 1994 Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. Lett. Nat. 370, 389-391; Zhao, H., Arnold, F.H., 1997 Optimization for DNA shuffling for high fidelity recombination. Nucleic Acids Res. 25, 1307-1308) com o intuito  
20 de desenvolver genes análogos mutantes, os quais também codificam para proteínas inibidores de alfa-amilases.

A técnica de *Embaralhamento de ADN* consiste em uma evolução molecular dirigida, a qual gera mudanças pontuais na estrutura primária das moléculas de ADN por meio de mutações randômicas (Ling Yuan, L. Kurek, I., English, J. and Keenan, R. Laboratory-  
25 directed protein evolution. Microbiology and Molecular Biology Reviews, Vol. 69, No. 3, p. 373 – 392, 2005; Stemmer, W. P. C. Rapid evolution of a protein in vitro By Embaralhamento de ADN. Nature. London, Vol. 370, p. 389 – 391, 1994, US5605793, US5811238, US5830721). Os genes de interesse são primeiramente fragmentados de forma aleatória em pequenas seqüências de 50-300 pares de base, sendo este produto recombinado

em uma reação de PCR (Reação da Polimerase em Cadeia), a qual é conduzida sem adição de oligonucleotídeos. Em uma segunda reação consecutiva, são adicionados os produtos da primeira reação e oligonucleotídeos específicos. Permitindo, desta forma, a amplificação de uma população de genes análogos mutantes/ variantes (Stemmer, W. P. C. Rapid evolution of a protein in vitro by Embaralhamento de ADN. Nature. London, Vol. 370, p. 389 – 391, 1994; Zhao, H. and Arnold, F.H. Functional and nonfunctional mutations distinguished by random recombination of homologous genes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., Vol. 94, p. 7997 – 8000, 1997).

A eficiência da técnica para produzir moléculas análogas de maior atividade biológica pôde ser comprovada em diversos trabalhos como, por exemplo, em Jager *et al* (Jager, S. A. W., Jekel, P. A. and Janssen, D. B. Hybrid penicillin acylases with improved properties for synthesis of  $\beta$ -lactam antibiotics. Enzyme And Microbial Technology, Vol. 40, p. 1335 – 1344, 2007), onde a atividade enzimática da penicilina aciclase aumentou em 90%. A técnica pode utilizar um único ou mais genes homólogos e seu sucesso dependente de um delicado arranjo entre o tamanho da biblioteca, a diversidade biológica originada e de uma metodologia de seleção das variantes com a característica desejada (Ling Yuan, L. Kurek, I., English, J. and Keenan, R. Laboratory-directed protein evolution. Microbiology and Molecular Biology Reviews, Vol. 69, No. 3, p. 373 – 392, 2005).

Diante disso, a presente invenção tem como objetivo solucionar o problema do uso abusivo de inseticidas químicos, bem como aumentar a resistência de plantas, gerando plantas transgênicas, as quais sejam capazes de expressar genes que codificam para moléculas com alta atividade inibitória de enzimas alfa-amilases

### SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se ao campo de controle de insetos-praga, utilizando métodos e composições que compreendem análogos mutantes de inibidores de alfa-amilases ( $\alpha$ AIIs).

Mais especificamente a presente invenção diz respeito a moléculas isoladas de ácido nucléico caracterizadas por compreender:

a) seqüências substancialmente similares a qualquer uma das seqüências selecionadas do grupo identificado como SEQ ID NO 1-2;

b) complementos das seqüências descritas em SEQ ID NO1-2;

c) complementos reversos das seqüências descritas em SEQ ID NO1-2;

5 d) seqüências reversas das seqüências descritas em SEQ ID NO1-2.

Uma segunda concretização da presente invenção diz respeito a uma construção gênica contendo a molécula isolada de ácido nucléico.

Uma terceira concretização da presente invenção diz respeito a um vetor binário caracterizado por conter uma construção gênica. Mais especificamente a presente invenção diz respeito a um vetor binário caracterizado por compreender:

10 a. um promotor opcionalmente ligado a uma seqüência líder e operacionalmente ligado a

b. uma seqüência codificadora substancialmente similar à qualquer uma das seqüências identificadas como SEQ ID NO1-2 operacionalmente ligada a;

15 c. um sinal de terminação;

d. uma origem de replicação;

e. um marcador seletivo; e

f. um sítio de clonagem

20 Uma quarta concretização da presente invenção diz respeito a polipeptídeos isolados, caracterizados por compreender seqüências substancialmente similares a qualquer uma das seqüências selecionadas do grupo identificado como SEQ ID NO 3-4.

Uma quinta concretização da presente invenção diz respeito a uma célula transformada caracterizada pelo fato de conter uma construção gênica ou um vetor binário contendo as moléculas de ácido nucléico da presente invenção; ou um polipeptídeo da presente invenção.

25 Uma sexta concretização da presente invenção diz respeito a uma planta, ou uma parte, ou um propágulo ou progênie da mesma caracterizada por compreender uma

construção gênica ou um vetor binário contendo as moléculas de ácido nucléico da presente invenção; ou um polipeptídeo da presente invenção.

Uma sétima concretização da presente invenção diz respeito a um microorganismo, ou uma parte do mesmo caracterizado por compreender uma construção gênica ou um vetor binário contendo as moléculas de ácido nucléico da presente invenção; ou um polipeptídeo da presente invenção.

Uma oitava concretização da presente invenção diz respeito a um método para produzir um organismo geneticamente modificado caracterizado pelo fato de compreender as seguintes etapas:

- 10 a. transformar uma célula, tecido, órgão ou embrião com uma construção gênica ou um vetor binário contendo as moléculas de ácido nucléico da presente invenção;
- b. selecionar células transformadas, calos de células, embriões ou sementes;
- c. regenerar plantas maduras, embriões maduros ou microorganismos de células transformadas, calos de células, embriões ou sementes selecionados na etapa (b);
- 15 d. selecionar plantas maduras, embriões maduros ou células de microorganismos da etapa (c) contendo a construção gênica ou vetor binário contendo as moléculas de ácido nucléico da presente invenção.

Uma nona concretização da presente invenção diz respeito a um método para produção de proteína recombinante caracterizado pelo fato de compreender as seguintes etapas:

- 20 a. transformar uma célula, tecido, órgão ou embrião com um vetor binário contendo as moléculas de ácido nucléico da presente invenção;
- b. selecionar células transformadas, calos de células, embriões ou sementes;
- 25 c. regenerar plantas maduras, embriões maduros ou microorganismos de células transformadas, calos de células, embriões ou sementes selecionados na etapa (b);
- d. selecionar plantas maduras, embriões maduros ou células de microorganismos da etapa (c) contendo vetor binário contendo as moléculas de ácido nucléico da presente invenção;

e. Fazer a extração da proteína recombinante produzida nos organismos selecionados na etapa (d).

Uma décima concretização da presente invenção diz respeito a uma proteína recombinante obtida através do método descrito na reivindicação 37.

5 Uma décima primeira concretização da presente invenção diz respeito a uma composição pesticida biodegradável caracterizada por compreender uma concentração eficaz do polipeptídeo isolado de acordo com qualquer uma das reivindicações de 21 a 25 ou análogo mutante, em um veículo carreador agronomicamente aceitável.

10 Uma décima segunda concretização da presente invenção diz respeito a um método para o controle de uma praga caracterizado por compreender as seguintes etapas: a) detectar a ocorrência da praga em um ambiente;

b) promover o contato da praga com uma proteína pesticida isolada ou com uma composição da invenção, em que a referida proteína consiste das seqüências selecionadas do grupo de seqüências de aminoácidos descritas em SEQ ID N°.3-4.

15 Uma décima terceira concretização da presente invenção diz respeito a um método de obtenção de linhagens transgênicas resistentes a um inseto praga, caracterizado por compreender as seguintes etapas:

a) transformar uma cultivar de interesse com uma construção gênica ou um vetor vetor binário contendo as moléculas de ácido nucléico da presente invenção;

20 b) regenerar linhagens transgênicas contendo a referida construção estavelmente integrada em seus genomas;

c) selecionar as linhagens transgênicas com os maiores níveis de expressão do inibidor de alfa amilase da invenção.

### **BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS**

25 **Figura 1.** Gráfico indicando o perfil cromatográfico da purificação das proteínas  $\alpha$ -amilases, extraídas de intestinos das larvas de *A. grandis*, utilizando resina de troca de íons. Gradiente linear decrescente de 1 a 0M de Sulfato de amônia (----), Absorbância á 280 nm (\_\_\_\_), Frações mostrando atividade de  $\alpha$ -amilases (2).

**Figura 2.** (a) Análise do perfil eletroforético em gel de poliacrilamida das proteínas frações eluídas na cromatografia (b) Zimograma indicando a presença da  $\alpha$ -amilase devido a degradação do iodo utilizado para corar o gel (banda clara indicado por seta) (Marc.) Indicador de massa molecular; (1) extrato proteico bruto; (2) Alíquota do agrupamento de frações do pico mostrando atividade enzimática (Figura 1).

**Figura 3.** Esquema da Técnica de *Embaralhamento de ADN* utilizando dois genes como substrato e análise da amplificação da população de genes  $\alpha AIs$  análogos mutantes com oligonucleotídeos específicos para inserção do sítio de restrição à enzima *SfiI*. Produto de fragmentação com DNase (II), ampliações (III) e reconstrução dos genes análogos mutantes (IV) analisadas em gel de agarose 2,5%.

**Figura 4.** Análise em gel de agarose 2,5% do produto de reconstrução dos genes análogos mutantes. (1) marcador de massa molecular, (2) alíquota do produto da degradação com DNase I; (3) Produto da amplificação sem uso de oligonucleotídeos (etapa III, Figura ), utilizando produto da fragmentação como molde; (4) Produto da amplificação utilizando os oligonucleotídeos específicos – reconstrução da população de análogos mutantes (660 bp). A seta indica o tamanho dos genes originais.

**Figura 5.** Gráfico contendo resultado do monitoramento de enriquecimento de fagos específicos, obtidos durante a seleção. Identificação do ciclo de seleção indicando o grupo com maior número de fagos específicos.

**Figura 6.** Representação esquemática mostrando a posição das mutações no alinhamento. Análise das modificações de bases nucleotídicas geradas pela técnica de *Embaralhamento de ADN* em comparação com nos genes parentais.

**Figura 7.** O alinhamento das sequências protéicas dos inibidores originais e análogos mutantes. Esquema ilustrativo do perfil de recombinação obtido para os genes análogos mutantes selecionados da biblioteca combinatória. Os números acima dos alinhamentos referem-se à posição de cada nucleotídeo na sequência. As sequências foram alinhadas utilizando o programa CLUSTALW2.

**Figura 8.** Mapa do vetor construído para expressão em plantas de Arabidopsis. Representação esquemática do vetor, incluindo o promotor 35S duplicado, enhancer do vírus do mosaico da alfafa e o terminador nopalina Sintetase.

**Figura 9.** Imunodeteção das proteínas extraídas das plantas transgênicas contendo o gene parental. Presença de proteínas muntantes isoladas de plantas transformadas com os genes originais e análogos, hibridizadas com anticorpo anti-inibidor de alfa-amilase.  $\alpha$ -AI-1(2), os genes análogos  $\alpha$ AIC3 (4) e  $\alpha$ AI-A11(5) e planta não transformada (3). As setas indicam massa molecular das subunidades  $\alpha$  (9 kDa) e  $\beta$  (14 kDa) da proteína madura.

**Figura 10.** Análise de expressão dos genes análogos  $\alpha$ AIs nas plantas transgênicas utilizando ensaio imunoenzimático (ELISA). Quantificação do produto de expressão do gene análogo  $\alpha$ ais em plantas transgênicas de Arabidopsis.

**Figura 11.** Gráfico da atividade inibitória in vitro utilizando proteínas totais dos variantes análogos selecionados, expressados em plantas modelo.

**Figura 12.** Representação da estrutura do complexo modelado contendo o  $\alpha$ AI-C3 e  $\alpha$ AI-A11(sobrepostos) e a alfa-amilase de *A. grandis*.

### **DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO**

A invenção descreve novos inibidores de alfa-amilases e métodos, os quais possibilitam a geração de tecnologias capazes de controlar insetos-praga de grande interesse econômico. Mais especificamente, os ácidos nucleicos (genes) da presente invenção, incluindo fragmentos e variantes dos mesmos, compreendem seqüências nucleotídicas substancialmente similares às seqüências identificadas como SEQ ID Nos 1-2, as quais codificam proteínas inibidoras substancialmente similares às seqüências identificadas como SEQ ID Nos 3-4 contendo massa aproximada de 24 kDa, processadas em duas subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  (15 kDa e 9 kDa). As proteínas inibidoras descritas são preferencialmente biologicamente ativas contra o inseto-praga pertencente à ordem Coleóptera: o bicudo-do-algodoeiro, *Anthonomus grandis*.

A invenção envolve uma estratégia para auxiliar no controle da praga, envolvendo as etapas de produção e seleção de genes novos para serem inseridos em plantas via

transgenia, afim de torná-las resistente a praga alvo. A produção envolve a recombinação e geração de novas moléculas e diz respeito ao produto da aplicação da técnica de DNA shuffling. A seleção diz respeito a aplicação da técnica de Phage display - resulta em escolha de genes de acordo com uma característica desejada. As técnicas utilizadas para produção e seleção de genes novos já estão bem descritas no estado da técnica.

Além das seqüências nucleotídicas, a presente invenção também descreve uma construção gênica e um vetor binário compreendendo as seqüências gênicas codificadoras de proteínas com alta atividade inibitória (número de depósito no ATCC: PTA-11584; PTA-11585 e PTA-11586). O vetor binário é ainda caracterizado por compreender:

a. um promotor opcionalmente ligado a uma seqüência líder e operacionalmente ligado a

b. uma seqüência codificadora substancialmente similar à qualquer uma das seqüências identificadas como SEQ ID NO1-2 operacionalmente ligada a;

c. um sinal de terminação;

d. uma origem de replicação;

e. um marcador seletivo; e

f. um sítio de clonagem

A presente invenção provê ainda uma célula, planta, microorganismos contendo as moléculas de ácido nucléico e/ou peptídeo da presente invenção.

A presente invenção provê novas técnicas, as quais não dependem do uso dos pesticidas químicos sintéticos tradicionais. A invenção diz respeito a pesticidas biodegradáveis ocorrendo naturalmente e genes codificando os mesmos.

A invenção provê a criação de genes análogos aos  $\alpha AI-1$  e  $\alpha AI-2$ , isolados de feijão. Foram criados por mutação *in vitro*, genes análogos mutantes também codificadores de inibidores de alfa-amilases.

A invenção diz respeito também a um método para produzir um organismo geneticamente modificado caracterizado pelo fato de compreender as seguintes etapas:

a. transformar uma célula, tecido, órgão ou embrião com uma construção gênica ou um vetor binário contendo as moléculas de ácido nucléico da presente invenção;

- b. selecionar células transformadas, calos de células, embriões ou sementes;
- c. regenerar plantas maduras, embriões maduros ou microorganismos de células transformadas, calos de células, embriões ou sementes selecionados na etapa (b);
- d. selecionar plantas maduras, embriões maduros ou células de microorganismos da etapa (c) contendo a construção gênica ou vetor binário contendo as moléculas de ácido nucléico da presente invenção.

A presente invenção diz respeito ainda a um método para produção de proteína recombinante caracterizado pelo fato de compreender as seguintes etapas:

- a. transformar uma célula, tecido, órgão ou embrião com um vetor binário contendo as moléculas de ácido nucléico da presente invenção;
- b. selecionar células transformadas, calos de células, embriões ou sementes;
- c. regenerar plantas maduras, embriões maduros ou microorganismos de células transformadas, calos de células, embriões ou sementes selecionados na etapa (b);
- d. selecionar plantas maduras, embriões maduros ou células de microorganismos da etapa (c) contendo vetor binário contendo as moléculas de ácido nucléico da presente invenção;
- e. Fazer a extração da proteína recombinante produzida nos organismos selecionados na etapa (d).

A presente invenção diz respeito também a uma composição pesticida biodegradável caracterizada por compreender uma concentração eficaz do polipeptídeo isolado da presente invenção ou análogo mutante, em um veículo carreador agronomicamente aceitável.

A invenção diz respeito a um método para o controle de uma praga caracterizado por compreender as seguintes etapas:

- a) detectar a ocorrência da praga em um ambiente;
- b) promover o contato da praga com uma proteína pesticida isolada ou com uma composição da invenção, em que a referida proteína consiste das seqüências selecionadas do grupo de seqüências de aminoácidos descritas em SEQ ID N° 3-4.

A invenção diz respeito também a um método de obtenção de linhagens transgênicas resistentes a um inseto praga, caracterizado por compreender as seguintes etapas:

a) transformar uma cultivar de interesse com uma construção gênica ou um vetor binário contendo as moléculas de ácido nucléico da presente invenção;

b) regenerar linhagens transgênicas contendo a referida construção estavelmente integrada em seus genomas;

5 c) selecionar as linhagens transgênicas com os maiores níveis de expressão do inibidor de alfa amilase da invenção.

Para a construção da biblioteca de ADN da presente invenção os inibidores de alfa-amilases, denominados  $\alpha AI-1$  e  $\alpha AI-2$ , foram recombinados. Os produtos dos genes originais possuem atividades específicas para as amilases de alguns insetos bruquídeos, mas não inibem a alfa-amilase do bicudo do algodoeiro. No entanto, os genes análogos mutantes gerados, quando expressados e proteoliticamente processados em plantas modelo possuem efeito diferenciado *in vitro* para a inibição das alfa-amilases do bicudo-do-algodoeiro.

Para alcançar o objetivo desejado, ou seja, obtenção de genes  $\alpha AIs$  análogos, para inibidores altamente ativos contra alfa-amilases do bicudo-do-algodoeiro, foram utilizados os genes  $\alpha AI-1$  e  $\alpha AI-2$ , isolado de feijão comum (*P. vulgaris*). Estes dois genes foram misturados e utilizados como substrato no processo de originar genes variantes pela técnica de Embaralhamento de ADN. Os variantes foram selecionados quanto a capacidade de se ligarem as enzimas alfa-amilases isoladas do intestino de insetos e larvas do bicudo-do-algodoeiro, pela técnica de apresentação de proteínas na superfície de bacteriófagos *Phage display* (Barbas III, C. F.; Burton, D. R.; Scott, J. K.; Silverman, G. J. Selection from antibody libraries. In: *Phage display – A laboratory manual –USA: Cold Spring Laboratory, p. 10.1-10.20, 2001*).

25 A construção de bibliotecas de genes análogos variantes, utilizando técnicas de evolução molecular *in vitro*, tem sido empregada nas últimas três décadas. Esse fato se deve ao surgimento de ferramentas biotecnológicas, as quais servem como plataforma de engenharia genética no desenvolvimento de novas moléculas com atividade melhorada, visando principalmente à agricultura e a indústria farmacêutica (Ling Yuan, L. Kurek, I., English, J. and Keenan, R. Laboratory-directed protein evolution. *Microbiology and Molecular Biology Review*. Vol. 69, No. 3, p. 373 – 392, 2005). Várias técnicas, incluindo

modificações químicas, PCR induzido ao erro e mutagênese sítio dirigida podem ser aplicadas para gerar mutações em uma seqüência gênica (Neylon, C. Chemical and biochemical strategies for the randomization of protein encoding DNA sequences: library construction methods for directed evolution. *Nucleic Acids Research*, vol. 32, N. 4, PP. 1448-1459, 2004). Preferencialmente na presente invenção destaca-se a técnica de *Embaralhamento de ADN* (Rosic, N. N., Huang, W., Johnston, W. A., James J. Devoss, J. J., Gillam, E. M. J. Extending the diversity of cytochrome P450 enzymes by ADN family shuffling. *Gene*, Vol. 35762, No of Pages 9, 2007; Ling Yuan, L. Kurek, I., English, J. and Keenan, R. Laboratory-directed protein evolution. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Vol. 69, No. 3, p. 373 – 392, 2005; Abécassis, V., Pompon, D. and Truan, G. High efficiency family shuffling based on multi-step PCR and in vivo ADN recombination in yeast: statistical analysis of a combinatorial library between human cytochrome P450 1A1 and 1A2. *Nucleic Acids Research*, Vol. 28, No. 20: E 88, 2000; Zhao, H. and Arnold, F.H. Functional and nonfunctional mutations distinguished by random recombination of homologous genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Vol. 94, p. 7997 – 8000, 1997; Stemmer, W. P. C. Rapid evolution of a protein in vitro By *Embaralhamento de ADN*. *Nature*. London, Vol. 370, p. 389 – 391, 1994). A estratégia de *Embaralhamento de ADN* aplicada na presente invenção apresenta a vantagem de gerar ao mesmo tempo grande diversidade em mutantes contendo mutações produzidas aleatoriamente.

Para a seleção dos variantes dos genes  $\alpha$ Als na presente invenção foi utilizada a técnica de apresentação de proteínas na superfície de bacteriófagos *Phage Display* (Zhang, Q., Bai, G., Cheng, J., Yu, Y., Tian, W. and Yang, W. Use of an enhanced green fluorescence protein linked to a single chain fragment variable antibody to localize *Bursaphelenchus xylophilus* cellulose. *Biosci. Biotechnol. Biochem*, Vol. 71, No 6, p. 1514 – 1520, 2007; Andris-Widhopf, J., Rader, C., Steinberger, P., Fuller, R., Barbas III, C. F. Methods for the generation of chicken monoclonal antibody fragments by *Phage display*. *Journal of Immunological Methods*, Vol. 242, p. 159 – 181, 2000; Stoop, A. A., Jespers, L., Lasters, I., Eldering, E. and Pannekoek, H. High-density mutagenesis by combined *Embaralhamento de ADN* 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). J. Mol. Biol., Vol. 301, p. 1135 – 1147, 2000; Barbas III, C. F., Bain, J. D., Hoekstra, D. M., And Lerner, R. A. Semisynthetic combinatorial antibody libraries: A chemical solution to the diversity problem. Proc. Nati. Acad. Sci. USA, Vol. 89, p. 4457 – 4461, 1992). A associação das técnicas de *Embaralhamento de ADN* e apresentação de proteínas na superfície de bacteriófagos *Phage Display* (criação de bibliotecas combinatórias), torna a seleção e a expressão de novas moléculas muito mais eficientes (Stoop, A. A., Jespers, L., Lasters, I., Eldering, E. And Pannekoek, H. High-density mutagenesis by combined *Embaralhamento de ADN* 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). J. Mol. Biol., Vol. 301, p. 1135 – 1147, 2000).

Ao final, os inibidores originais  $\alpha$ AI-1 e  $\alpha$ AI-2 e seus análogos mutantes tiveram seus efeitos de inibição enzimática avaliados *in vitro* utilizando extratos protéicos de plantas-modelo transformadas com esses genes. Para isso, os originais e seus genes análogos selecionados foram subclonados em vetor binário para expressão em plantas e as proteínas recombinantes geradas utilizadas em ensaios *in vitro* contra a principal praga do algodoeiro: o bicudo-do-algodoeiro.

Na descrição que segue, um número de termos são utilizados extensivamente. As seguintes definições são providas para facilitar o entendimento da invenção.

O termo “molécula isolada de ácido nucleico” é utilizado para se referenciar aos ácidos nucleicos da presente invenção. Este termo, quando aplicado para o DNA da presente invenção, refere-se à molécula de DNA que é originada da recombinação de duas moléculas de DNA ( $\alpha$ AI-1 e  $\alpha$ AI-2 ). Por exemplo, a “molécula isolada de ácido nucleico” pode estar inserida em um vetor , tal como um plasmídeo ou um vetor de vírus, ou integrado dentro de um DNA genômico de um procarioto ou eucarioto. Uma “molécula isolada de ácido nucleico” pode compreender também uma molécula de cDNA. Uma molécula isolada de ácido nucleico inserida em um vetor é também referida às vezes aqui como molécula de ácido nucleico recombinante. O termo “molécula isolada de ácido

nucleico” também poderá ser aplicado à moléculas de RNA transcritas de uma molécula de DNA conforme descrita acima.

A definição dos termos “complemento”, “complemento reverso” e “seqüência reversa” como usados aqui é ilustrada pelo seguinte exemplo: para a seqüência  
5 5’AGTGAAGT3’, o complemento é 3’TCACTTCA5’, o complemento reverso é  
3’ACTTCACT5’ e a seqüência reversa é 5’TGAAGTGA3’.

Como usado aqui, o termo “variante” ou “substancialmente similar” ou ainda “análogo peptídico” ou “análogo mutante” compreende seqüências de aminoácidos ou nucleotídeos diferentes de seqüências especificamente identificadas, em que um ou mais  
10 nucleotídeos ou resíduos de aminoácidos é deletado, substituído ou adicionado e que pode ter sua atividade biológica alterada, auxiliada, aumentada ou diminuída quando comparada com a proteína parental nativa ou não-mutada. As variantes podem ser variantes alélicas, de ocorrência natural, ou variantes de ocorrência não natural. As seqüências variantes ou substancialmente similares dizem respeito a fragmentos de ácidos nucléicos ou peptídeos  
15 que podem ser caracterizados pela porcentagem de identidade de suas seqüências de nucleotídeos ou aminoácidos com as seqüências de nucleotídeo (SEQ ID Nos 1-2) ou de aminoácidos (SEQ ID Nos 3-4) descritas aqui, como determinada por algoritmos comuns empregados no estado da técnica. Os fragmentos de ácidos nucléicos ou peptídeos preferidos são aqueles cujas seqüências de nucleotídeos ou aminoácidos têm pelo menos  
20 cerca de 40 ou 45% de identidade de seqüência, preferencialmente cerca de 50% ou 55% de identidade de seqüência, mais preferencialmente cerca de 60% ou 65% de identidade de seqüência, mais preferencialmente cerca de 70% ou 75% de identidade de seqüência, mais preferencialmente cerca de 80% ou 85% de identidade de seqüência, mais preferencialmente ainda com cerca de 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%  
25 ou 99% de identidade de seqüência quando comparada com a seqüência de referência. A identidade percentual é determinada pelo alinhamento de duas seqüências a serem comparadas, determinando o número de resíduos idênticos na porção alinhada, dividindo este número pelo número total de resíduos na seqüência pesquisada e multiplicando o resultado por 100. Esse alinhamento pode ser feito através de ferramentas de domínio

público, como BLASTN e BLASTP, disponíveis na página do Centro Nacional para Informação Biotecnológica/NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). O alinhamento de seqüência e o cálculo de porcentagem de identidade da presente invenção foram realizados conforme descrito com as seqüências depositadas no Banco de Genes. O termo “análogos sintéticos” como citado nesta invenção diz respeito a modificação das sequências nucleotídica dos variantes selecionados. Modificações em substituições de bases nucleotídicas apropriando ao códon preferencial de bases, próprio da planta utilizada na transformação genética. A nova sequência é obtida por síntese química e as substituições nos nucleotídeos não representam alterações na sequência traduzida de aminoácidos.

10 “Seqüência codificadora” refere-se à seqüência de DNA que codifica uma proteína específica e exclui a seqüência não codificadora. Uma “seqüência codificadora interrompida” significa a seqüência que atua como separadora (por exemplo, um ou mais íntrons ligados através de junções). Um “íntron” é uma seqüência de nucleotídeo que é transcrita e está presente no pré mRNA, mas é removida através de clivagem e a re-ligação do mRNA dentro da célula gerando um mRNA maduro que pode ser traduzido em uma proteína. Exemplos de íntrons incluem, mas não são limitados a, íntron pdk2, íntron catalase da mamona, íntron Delta 12 desnaturase de algodão, Delta 12 desnaturase de Arabidopsis, íntron ubiquitina de milho, íntron de SV40, íntrons do gene da malato sintase.

20 Uma “construção gênica” é um gene compreendendo um promotor e uma região codificadora de diferentes origens. No caso da presente invenção, a construção gênica compreende os polinucleotídeos da presente invenção ligados de forma associada ou isoladamente à regiões reguladoras da expressão, como promotores e sinais de terminação.

25 A obtenção de construções gênicas compreendendo promotores ligados a ácidos nucleicos é conhecida no estado da técnica e pode ser encontrada em Sambrook, et al. (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed. (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press).

O termo “vetor” diz respeito a um replicon, como plasmídeo, fago ou vírus, no qual outras seqüências genéticas ou elementos (sejam eles de ADN ou RNA) podem ser ligados.

Desta forma, os genes podem ser replicados juntamente com o vetor. Preferencialmente um dos vetores de interesse da presente invenção diz respeito ao fagomídeo. O termo “fagomídeo” diz respeito a um vetor que contém seqüência para replicação em fago e em bactéria, este vetor tem características que atendem as especificações da célula hospedeira bem como agentes selecionadores e promotores. Um exemplo é o fagomídeo pComb3X (Andris-Widhopf, J.; Rader, C.; Steinberger, P.; Fuller, R., Barbas III, C. F. Methods for the generation of chicken monoclonal antibody fragments by Phage display. Journal of Immunological Methods, 242: 159-181, 2000), que tem como característica fusionar a gene de interesse ao gene da proteína III, do bacteriófago filamentosso M13, localizada no capsídeo viral. O termo “vetor recombinante” é resultante da combinação de um vetor comercial com genes da presente invenção operacionalmente ligado a um polinucleotídeo endógeno e/ou heterólogo de interesse que por sua vez está operacionalmente ligado a um sinal de terminação. Tais vetores podem ser obtidos comercialmente, incluindo Clontech Laboratories, Inc (Palo Alto, Calif.), Stratagene (La Jolla, Calif), Invitrogen (Carlsbad, Calif.), New England Biolabs (Beverly, Mass.) e Promega (Madison, Wis.). Alguns exemplos de vetores utilizados na presente invenção, mas não limitados, são os vetores pGEM-T easy (Promega Corporation), pCambia 2300 (Canberra, Austrália), pComb3X (Andris-Widhopf, J.; Rader, C.; Steinberger, P.; Fuller, R., Barbas III, C. F. Methods for the generation of chicken monoclonal antibody fragments by Phage display. Journal of Immunological Methods, 242: 159-181, 2000). A obtenção de vetores recombinantes compreendendo promotores ligados a ácidos nucleicos é conhecida no estado da técnica e pode ser encontrada em Sambrook et al. (Sambrook, J., Russell, D. W., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989).

Um “vetor binário” é um vetor derivado de plasmídios capazes de se replicar tanto em *Escherichia coli* quanto em *Agrobacterium*. Preferencialmente para a presente invenção foram utilizados os vetores binários: pFSpl2300AIC3 (número ATCC PTA11586), pFSpl2300AIG4 (número ATCC PTA11584) e pFSpl2300AIA11 (número ATCC PTA11585). Um vetor de transformação de plantas baseado no sistema *Agrobacterium* do tipo binário deve conter uma origem de replicação apropriada e um gene de seleção em

bactéria, geralmente resistência a um antibiótico. Além disso, é desejável que ele contenha uma região de múltiplos sítios de clonagem (contendo sequências de enzimas de restrição) entre as extremidades do T-DNA, para a inserção das sequências gênicas desejadas, e uma região de transferência (ori I) e sítio de ativação para conjugação. Uma vez obtido o vetor binário com a sequência desejada do gene, operacionalmente ligado, ele deve ser transferido para *Agrobacterium*. Tais vetores podem ser obtidos comercialmente, incluindo Clontech Laboratories, Inc (Palo Alto, Calif.), Stratagene (La Jolla, Calif), Invitrogen (Carlsbad, Calif.), New England Biolabs (Beverly, Mass.) e Promega (Madison, Wis.) ou adquiridos por doação pública (série pCambia, Canberra, Austrália). O termo “operacionalmente ligado” significa que as sequências regulatórias necessárias para expressão da sequência codificante são colocadas na molécula de ADN em posições apropriadas relativas à sequência codificante para efeito de sua expressão. Essa mesma definição é às vezes aplicada para o arranjo de sequências codificantes e elementos controladores da transcrição (por exemplo, promotores, acentuadores ou “enhancers” e elementos de terminação) no vetor binário. Uma região codificante exógena é tipicamente flanqueada por regiões regulatórias operacionalmente ligadas que regulam a expressão da região codificante exógena em uma célula transformada (podendo ser microrganismo, vegetal ou animal). Uma região regulatória típica operacionalmente ligada a uma região codificante exógena inclui um promotor, isto é, um fragmento de ácido nucléico que pode causar transcrição de regiões codificantes exógenas, posicionado na região 5’ da região codificante exógena.

O termo “operacionalmente ligado” significa que as sequências regulatórias necessárias para expressão da sequência codificante são colocadas na molécula de DNA em posições apropriadas relativas à sequência codificante para efeito de sua expressão. Essa mesma definição é às vezes aplicada para o arranjo de sequências codificantes e elementos controladores da transcrição (por exemplo, promotores, acentuadores ou “enhancers” e elementos de terminação) no vetor binário. Uma região codificante exógena é tipicamente flanqueada por regiões regulatórias operacionalmente ligadas que regulam a expressão da região codificante exógena em uma célula transformada (podendo ser microrganismo,

vegetal ou animal). Uma região regulatória típica operacionalmente ligada a uma região codificante exógena inclui um promotor, isto é, um fragmento de ácido nucleico que pode causar transcrição de regiões codificantes exógenas, posicionado na região 5' da região codificante exógena. A presente invenção não está limitada para o uso de qualquer promotor em particular e uma ampla variedade de promotores são conhecidos no estado da técnica. Os promotores podem ser, mas não estão limitados a, induzíveis, constitutivos e tecido-específicos. Preferencialmente, o promotor da presente invenção é escolhido do grupo dos promotores dos genes da fibra de algodão, podendo ser, mas não estando limitado a E6, H6S, Rac13, LTP, ACP, Expansina, CAP, Anexina, FbL2A e actina 2.

10 Em um dos aspectos da invenção, o promotor é um promotor constitutivo. Em outro aspecto da invenção, a atividade do promotor é estimulada por fatores externos ou internos tais como, mas não limitado a, hormônios, compostos químicos, impulsos mecânicos, e condições de estresse biótico ou abiótico. A atividade do promotor também pode ser regulada de maneira temporal e espacial (como por exemplo, promotores tecido-específicos e promotores regulados durante o desenvolvimento).

15 O promotor pode conter elementos “enhancers”. Um “enhancer” é uma sequência de DNA que pode estimular a atividade do promotor. Ela pode ser um elemento inato do promotor ou um elemento heterólogo inserido para aumentar o nível e/ou a tecido-especificidade de um promotor. “Promotores constitutivos” referem-se àqueles que dirigem a expressão gênica em todos os tecidos e durante todo tempo. Promotores “tecido-específicos” ou “desenvolvimento-específicos” são aqueles que dirigem a expressão gênica quase que exclusivamente em tecidos específicos, tais como folhas, raízes, caules, flores, frutos ou sementes, ou em estágios do desenvolvimento específicos em um tecido, como no início ou final da embriogênese.

25 Em um dos aspectos da invenção, o promotor é um promotor expresso em plantas. Como usado aqui, o termo “promotor expresso em plantas” significa uma sequência de ADN que é capaz de iniciar e/ou controlar a transcrição em uma célula de planta. Isso inclui qualquer promotor de origem vegetal; qualquer promotor de origem não vegetal que seja capaz de direcionar a síntese do gene presente no T-ADN de *Agrobacterium*; promotores

tecido-específicos ou órgão-específicos, incluindo mas não limitados a promotores semente-específicos (WO8903887), promotores específicos de órgãos primordiais (como mencionado no pedido de patente US20030175783, An, Y. Q., Huang, S., McDowell, J. M., McKinney, E. C., Meagher, R. B., Conserved expression of the Arabidopsis ACT1 and ACT3 actin subclass in organ primordia and mature pollen. *The Plant Cell* 8, 15-30, 1996),  
5 promotores específicos de caule (como mencionado no pedido de patente US20030175783, Keller, B., Sauer, N., Lamb, C. J., Glycine-rich cell wall proteins in bean: Gene structure and association of the protein with the vascular system. *EMBO J.* 7: 3625-3633, 1988),  
10 promotores específicos de folhas (como mencionado no pedido de patente US20030175783, Hudspeth, R. L., Grula, J. W., Structure and expression of the maize gene encoding the phosphoenolpyruvate carboxylase involved in C4 photosynthesis. *Plant Mol Biol* 12:579-589, 1989), promotores específicos de mesófilo, promotores específicos de raiz (como mencionado no pedido de patente US20030175783, Keller, B., Lamb, C. J., Specific expression of a novel cell wall hydroxyproline-rich glycoprotein gene in lateral root initiation. *Genes Devel.* 3:1639-1646, 1989),  
15 promotores específicos de tubérculos (como mencionado no pedido de patente US20030175783, Keil, M., Sánchez-Serrano, J. J., Willmitzer, L., Both wound-inducible and tuber-specific expression are mediated by the promoter of a single member of the potato proteinase inhibitor II gene family. *EMBO J.* 8: 1323:1330, 1989), promotores específicos de tecidos vasculares (como mencionado no  
20 pedido de patente US20030175783, Peleman J., Saito, K., Cottyn, B., Engler, G., Seurinck, J., Van Montagu, M., Inze, D., Structure and expression analyses of the S-adenosylmethionine synthetase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* 84: 359-369, 1989), promotores específicos de estames (WO8910396, WO9213956), promotores específicos da zona de deiscência (WO9713865); e semelhantes. A invenção  
25 preferencialmente inclui promotores de genes da fibra de algodão, que incluem mas não estão limitados aos promotores dos genes E6, H6S, Rac13, LTP, ACP, expansina, CAP, anexina, FbL2A e actina2.

Como usado aqui, o termo “promotor expresso em bactérias” significa uma seqüência de DNA que é capaz de iniciar e/ou controlar a transcrição em uma célula

bacteriana. Como usado aqui, o termo “promotor expresso em fungos” significa uma seqüência de DNA que é capaz de iniciar e/ou controlar a transcrição em uma célula de fungo. Como usado aqui, o termo “promotor expresso em insetos” significa uma seqüência de DNA que é capaz de iniciar e/ou controlar a transcrição em uma célula de inseto.

5 Uma “seqüência líder” ou “seqüência sinal” na presente invenção significa uma seqüência de ácido nucleico que, quando operacionalmente ligada a uma molécula de ácido nucleico, permite a secreção do produto da molécula de ácido nucleico. A seqüência líder está preferencialmente localizada na região 5’ da molécula de ácido nucleico. Preferencialmente, a seqüência líder é obtida do mesmo gene que o promotor utilizado para  
10 dirigir a transcrição da molécula de ácido nucleico, ou é obtida do gene onde a molécula de ácido nucleico é derivada. Preferencialmente a presente invenção utiliza a seqüência sinal proveniente de uma cultivar de algodão brasileira.

O sinal de terminação da transcrição e a região de poliadenilação da presente invenção inclui, mas não está limitado a, sinal de terminação de SV40, sinal de adenilação  
15 de HSV TK, sinal de terminação do gene da nopalina sintetase de *Agrobacterium tumefaciens* (NOS), sinal de terminação do gene da octopina sintetase, sinal de terminação do gene 19S e 35S do CaMV, sinal de terminação do gene da álcool desidrogenase de milho, sinal de terminação do gene da manopina sintetase, sinal de terminação do gene da beta-faseolina, sinal de terminação do gene da ssRUBISCO, sinal de terminação do gene da  
20 sucrose sintetase, sinal de terminação do vírus que ataca o *Trifolium subterranean* (SCSV), sinal de terminação do gene *trpC* de *Aspergillus nidulans*, e outros semelhantes.

Conforme descrito anteriormente, a expressão “vetores binários” pode compreender um promotor induzível operacionalmente ligado a uma seqüência de ácido nucléico codificando a proteína inseticida da presente invenção. Promotores “induzíveis” podem  
25 dirigir a expressão de um polinucleotídeo com o qual eles estejam operacionalmente ligados, em um tecido ou estágio específico do desenvolvimento ou respondendo a condições ambientais. Em um dos aspectos da invenção, vetores de expressão compreendem um promotor induzível firmemente regulado operacionalmente ligado à uma molécula de ácido nucleico codificando uma proteína inseticida. Tal vetor binário pode

adicionalmente compreender um gene marcador de seleção (por exemplo, um gene codificando uma proteína que confere resistência a antibiótico) operacionalmente ligado a um promotor constitutivo ou a um promotor induzível firmemente regulado. Dependendo da aplicação, ele pode beneficiar a expressão da seqüência de ácido nucleico codificando  
5 uma proteína inseticida através de um promotor induzível de inseto-praga. Em um aspecto da presente invenção pode ser vantajoso utilizar promotores que são expressos localmente ou próximo do sítio de infecção da praga.

O termo “marcador seletivo” é referido aqui como sendo seqüências que conferem resistência a antibióticos ou serem marcadores visuais. Preferencialmente os marcadores  
10 podem ser selecionados do grupo de, mas não estando limitado a, seqüências codificadoras dos genes canamicina, neomicina, ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, higromicina, geneticina, fosfotricina, glifosato, glufosinato de amônio, AHAS, BAR e GUS. Organismos (plantas ou bactérias) sobreviventes ao gene marcador (ou gene de resistência) em meio de cultivo ou em aplicações tópicas são indicados como transformantes positivos  
15 caracterizados pela presença de gene exógeno integrado ao genoma desse organismo.

O termo “oligonucleotídeo” é referido aqui como ‘primers’ e ‘sondas’ da presente invenção, e é definido como uma molécula de ácido nucleico compreendendo de dez a noventa deoxiribonucleotídeos, preferencialmente mais do que oito. O tamanho exato dos oligonucleotídeos é dependente dos fatores experimentais particulares de cada etapa do  
20 processo.

Conforme usado na presente invenção, os termos “codificador”, “codificando” ou “codificado” quando usados no contexto de uma seqüência nucleotídica específica significa a mesma possui uma informação, a qual será traduzida biologicamente da seqüência de nucleotídeo para uma sequencia proteica específica. A informação pela qual uma proteína é  
25 codificada é especificada pelo uso de códons. Estes códons são explorados por cada organismo vivo de maneira diferenciada podendo partes de seqüências nucleotídicas distintas serem traduzidas biologicamente em codons idênticos.

O termo “gene” corresponde a uma seqüência nucleotídica específica localizada em uma região em particular do cromossomo, sendo responsável por codificar um produto final

específico. O gene também carrega em sua estrutura primária toda a informação necessária para os processos de transcrição e tradução biológica, como por exemplo, regiões promotoras e reguladoras da transcrição. No caso da presente invenção, gene compreende as seqüências nucleotídicas codificadoras correspondente aos inibidores ( $\alpha$ AIs) provenientes de *P.vulgaris* e aos seus análogos.

Os termos “polipeptídeo”, “peptídeo” e “proteína” são usados de forma interrelacionados para referir a um polímero de resíduos de aminoácidos. Os termos aplicam-se para polímeros de aminoácidos onde um ou mais resíduo de aminoácido é um análogo químico artificial de um aminoácido correspondente ocorrendo naturalmente, bem como para polímeros de aminoácidos ocorrendo naturalmente.

Polipeptídeos da invenção podem ser produzidos ou através de um ácido nucleico descrito aqui, ou pelo uso de técnicas padrões de biologia molecular. Por exemplo, uma proteína truncada da invenção pode ser produzida pela expressão de um ácido nucleico recombinante da invenção em uma célula hospedeira apropriada, ou alternativamente pela combinação de procedimentos, tais como digestão utilizando protease e purificação.

Na presente invenção os polipeptídeos isolados são caracterizados por compreender seqüências substancialmente similares a qualquer uma das seqüências selecionadas do grupo identificado como SEQ ID NO 3-4 e exibirem atividade inseticida, quando administrado oralmente, a larvas de insetos susceptíveis. Os polipeptídeos da presente invenção são caracterizados por exibir atividade inseticida, quando fornecido em uma dieta administrada oralmente a uma larva de inseto coleóptero, mais especificamente a larva de inseto ser uma larva de bicudo-do-algodoeiro. Mais especificamente, os polipeptídeos isolados da presente invenção são caracterizados por ser um inibidor de  $\alpha$ -amilase.

Na presente invenção o termo “proteína recombinante” se refere as moléculas quiméricas obtidas a partir da aplicação da técnica de embaralhamento do DNA de genes (codificadores de inibidores de alfa-amilases). Podendo ser essas moléculas expressadas, mas não somente, em fagos, bactérias leveduras e plantas. Preferencialmente, a proteína recombinante da presente invenção é caracterizada por ter atividade inibidora de alfa amilase.

O termo “substancialmente pura” refere-se a preparações compreendendo pelo menos 50-60% de peso do componente de interesse (por exemplo, ácido nucleico, oligonucleotídeo, polipeptídeo, proteína, etc). Mais preferencialmente, a preparação compreende pelo menos 75% de peso, e mais preferencialmente 90-99% de peso do  
5 componente de interesse. A pureza é medida por meio de métodos apropriados para o componente de interesse (por exemplo, espectometria de massa e similares).

O termo “gene isolado” é utilizado na presente invenção. Este termo refere-se a sequência nucleotídica existente em determinado genoma, especificamente de feijão comum *P. vulgaris* que codifica para uma proteína.

10 O termo “proteína isolada” ou “proteína isolada e purificada” é, às vezes, utilizado na presente invenção. Este termo refere-se a uma proteína produzida pela expressão de uma molécula de ácido nucleico isolada da presente invenção. Alternativamente, este termo pode referir-se a uma proteína que tem sido suficientemente separada de outras proteínas que ela  
15 poderia estar naturalmente associada, tal como ela existe na sua forma “substancialmente pura”. O termo “isolado” não exclui misturas sintéticas ou artificiais com outros compostos ou materiais, ou a presença de impurezas que não interferem com a atividade fundamental da proteína, e que pode estar presente, por exemplo, em uma purificação incompleta, adição de estabilizadores, ou combinados dentro, por exemplo, em uma composição  
agriculturalmente aceitável.

20 O termo “atividade biológica” diz respeito a uma função ou um grupo de funções executado por uma molécula em um contexto biológico (isto é, em um organismo ou substituto *in vitro* ou algum outro modelo similar). Para as proteínas inibidores de enzimas digestivas, a atividade biológica é caracterizada pelo processamento proteolítico pós  
25 traducional e pelas propriedades físico-químicas como por exemplo, a presença de resíduos que formam o sítio ativo, causando afinidade (ligação ou acomodação com enzimas específicas). Esta afinidade por moléculas pode ser ocasionada pela simples interação química entre ambas.

Como usado aqui, o termo “impactando insetos-praga” refere-se ao efeito de mudar nos insetos a alimentação, crescimento, e/ou comportamento em qualquer estágio do

desenvolvimento, incluindo, mas não limitado a: matar o inseto; retardar o crescimento; impedir capacidade reprodutiva; atividade anti-alimentação; e outros semelhantes.

Os termos “atividade pesticida” e “atividade inseticida” são utilizados sinonimamente para referir-se a atividade de um organismo ou uma substância (p.ex: uma proteína) que pode ser medida por, mas não estando limitada a mortalidade da praga, perda de peso da praga, repelência à pragas, e outros comportamentos e mudanças físicas de uma praga depois da alimentação e exposição por um apropriado período de tempo. Dessa forma, o impacto da atividade pesticida deve ter pelo menos um parâmetro mensurável de aptidão da praga. Por exemplo, “proteínas pesticidas e/ou inseticidas” são proteínas que desencadeiam a atividade pesticida por elas mesmas ou em combinação com outras proteínas. Inibidores de enzimas alfa-amilases são proteínas pesticidas. Outros exemplos de proteínas pesticidas incluem, por exemplo,  $\delta$ -endotoxinas pentina-1 e jaburetox.

O termo “quantidade efetiva de pesticida” diz respeito a uma quantidade de uma substância ou organismo que tem atividade pesticida quando presente no ambiente da praga. Para cada substância ou organismo, a quantidade efetiva de pesticida é determinada empiricamente para cada praga afetada em um ambiente específico. Similarmente o termo “quantidade efetiva de pesticida” pode ser usado para referir a uma “quantidade efetiva de pesticida” quando uma praga é um inseto-praga. O termo “composição pesticida biodegradável” é caracterizado por ser produtos ou substâncias liberadas no solo para ação em ambiente de praga, podendo ser degradados por ação de microorganismos, fotólise, oxidação, entre outros, em um período curto de tempo. As composições biodegradáveis envolvem substâncias classificadas como organofosforados, carbamatos, triazinas, anilinas, podem ser colocadas na forma de estacas que podem ser introduzidas no solo sem danos permanentes. Os produtos geralmente compreendem um aglutinante polimérico sólido, hidrófilo, solúvel em água, a um pesticida sistêmico. Ainda, o pesticida biodegradável se caracteriza pelo fato de que um veículo carreador aceitável pode ser um agente superfície-ativo, um veículo carreador inerte, um preservativo, um umectante, um estimulante de alimentação, um atrativo, um agente encapsulante, um ligante, um emulsificador, um corante, um protetor uv (ultra-violeta), um tampão, um agente de fluxo

ou fertilizante, doadores de micronutriente, ou outras preparações que influenciam o crescimento da planta. A composição pesticida biodegradável é caracterizada pelo fato de o veículo carreador aceitável ser um microorganismo transformado. Na presente invenção a composição pesticida biodegradável é caracterizada pelo fato de o polipeptídeo da presente invenção ou análogo mutante ser usado em combinação com  $\delta$ -endotoxinas Bt ou outras proteínas inseticidas.

O termo “recombinantemente engenheirado” ou “engenheirado” diz respeito a utilização da tecnologia do ADN recombinante para gerar (engenheirar) uma mudança na estrutura da proteína baseando-se no entendimento do mecanismo de ação da mesma, podendo os aminoácidos serem introduzidos, deletados ou substituídos.

O termo “Embaralhamento de ADN” é utilizado para descrever um método empregado em evolução molecular dirigida in vitro para gerar variantes de uma única seqüência gênica, ou duas ou mais seqüências gênicas homólogas por meio de recombinações de fragmentos gerados randomicamente, com recuperação de seqüências modificadas e com conseqüente modificação de resíduos de aminoácidos na proteína codificada pelo análogo mutante.

O termo “apresentação de proteínas na superfície de bacteriófagos - *Phage display*” diz respeito a um sistema de expressão e de interações de proteínas fusionadas a bacteriófagos que permitem uma varredura em células, tecidos ou órgãos a procura de pares receptor-ligantes, sendo esses ligantes, proteínas que se ligam aos receptores presentes no alvo em estudo.

Como usado aqui, o termo “seqüência de nucleotídeo mutada” ou “mutação” ou “seqüência de nucleotídeo mutageneizada” diz respeito a uma seqüência de nucleotídeo que tem sido mutada ou alterada para conter um ou mais resíduos de nucleotídeos (p.ex.: pares de base) que não está presente no tipo selvagem ou na seqüência não-mutada. Tal mutagênese ou alteração consiste de uma ou mais adições, deleções, ou substituições ou realocamento de resíduos de ácidos nucleicos.

Como usado aqui, o termo “melhora da atividade inseticida” ou “melhora da atividade pesticida” caracteriza um polipeptídeo ou um inibidor de alfa-amilase da invenção que

possui a atividade pesticida contra coleópteros melhorada em relação aos inibidores originais que não sejam efetivos contra insetos. Para medir a melhora da atividade pesticida ou inseticida deve-se requerer uma demonstração de presença ou aumento da atividade inibitória de alfa-amilases de pelo menos 10%, contra o inseto alvo, e mais preferencialmente 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 100%, 200% ou um maior aumento de inibição da atividade de alfa-amilases com relação à atividade inseticida de outros inibidores de alfa-amilases existentes que sejam ativos contra o mesmo inseto.

O termo “inibidor” ou inibidor de alfa-amilases, ou inibidor de enzimas digestivas está relacionado a um polipeptídeo, o qual apresenta atividade de degradação enzimática com efeito anti-nutricional e inseticida. É conhecido, no estado da técnica, que os inibidores de alfa-amilases de ocorrência natural, são sintetizados por plantas, especificamente planta de feijão comum (*P. vulgaris*).

Um especialista no assunto tem conhecimento dos avanços no campo da biologia molecular tais como uma mutagênese sítio-específica ou ao acaso, metodologia da reação de polimerase em cadeia (PCR), e técnicas da engenharia protéica provém uma extensiva coleção de ferramentas e protocolos viáveis para o uso para alterar ou engenheirar ambas as seqüências de aminoácido e seqüências genéticas disfarçadas de proteínas de interesse agrícola. Então, as proteínas pesticidas da invenção podem ser alteradas de várias maneiras, incluindo substituição de aminoácido, deleções, truncações, e inserções. Métodos para tais manipulações são geralmente conhecidos no estado da técnica. Por exemplo, uma seqüência de aminoácido variante da proteína pesticida da presente invenção pode ser preparada pela introdução de mutações dentro de um ácido nucleico sintético (p.ex.: molécula de ADN). Métodos para mutagênese e alterações em ácidos nucleicos são bem descritos no estado da técnica.

Entende-se que os polipeptídeos da invenção podem ser produzidos tanto pela expressão de um ácido nucleico descrito aqui, ou pelo uso de técnicas padrões de biologia molecular.

Descreve-se que um método para o controle de uma praga pode ser caracterizado por compreender as seguintes etapas: a) detectar a ocorrência da praga em um ambiente; b)

promover o contato da praga com uma proteína pesticida isolada ou produzida como uma composição da presente invenção.

Sabe-se que proteínas pesticidas podem ser oligoméricas e variam em peso molecular, número de resíduos, componentes peptídicos, atividades contra pragas particulares, e outras características. No entanto, pelos métodos descritos aqui, proteínas ativas contra uma variedade de pragas podem ser isoladas e caracterizadas. As proteínas pesticidas da invenção podem ser usadas em combinação ou outras proteínas inseticidas, por exemplo  $\delta$ -endotoxinas Bt para aumentar a ação no inseto alvo. Além do mais, o uso de proteínas pesticidas da presente invenção em combinação com  $\delta$ -endotoxinas de Bt ou outros princípios inseticidas de uma natureza diferente podem ter uma utilidade particular para prevenção e/ou manejo da resistência à inseto. Outros princípios inseticidas incluem, mas não estão limitados a outros tipos de inibidores de protease (ambos serina e cisteína), lectinas, e peroxidases.

A invenção também diz respeito a plantas transformadas com pelo menos um ácido nucleico da presente invenção, com um gene quimérico compreendendo o ácido nucleico, ou com um vetor binário compreendendo o gene quimérico. Preferencialmente, o microrganismo é um que se multiplica em plantas. Mais preferencialmente, o microrganismo é uma bactéria colonizadora de raiz. Uma concretização da presente invenção diz respeito a uma proteína pesticida encapsulada, que compreende um microrganismo transformado compreendendo pelo menos uma proteína pesticida da invenção.

A invenção também provê um método de aumentar o alcance do inseto alvo através do uso de proteínas pesticidas da invenção em combinação com pelo menos uma segunda proteína pesticida que seja diferente da proteína pesticida da invenção. Qualquer proteína pesticida conhecida no estado da técnica pode ser utilizada no método da presente invenção. Tais proteínas pesticidas incluem, mas não estão limitadas a  $\delta$ -endotoxinas de Bt, inibidores de protease, lectinas, alfa amilases, hidrolases acil lipídicas, e peroxidases.

A invenção também compreende plantas transgênicas ou transformadas compreendendo pelo menos uma seqüência nucleotídica da invenção. Preferencialmente, a

planta é estavelmente transformada com um gene quimérico, compreendendo pelo menos uma seqüência nucleotídica da invenção operacionalmente ligada a um promotor que dirige a expressão em células vegetais. Como usado aqui, o termo “plantas transgênicas” ou “plantas transformadas” refere-se a uma planta que compreende dentro de seu genoma um polinucleotídeo heterólogo. Geralmente, o polinucleotídeo heterólogo é integrado ao genoma de uma planta transgênica, de forma estável para que o polinucleotídeo seja passado para gerações sucessivas. O polinucleotídeo heterólogo pode ser integrado dentro do genoma sozinho ou como parte de um vetor recombinante.

Como usado aqui, o termo “transgênico” inclui qualquer célula, linhagem celular, calos, tecidos, parte da planta, ou genótipo da planta que tem sido alterado pela presença do ácido nucleico heterólogo incluindo aqueles transgênicos inicialmente alterados bem como aqueles criados por cruzamento sexual ou propagação sexual do transgênico sexual.

O termo “plantas” refere-se a organismos fotossintéticos, ambos eucariotos e procariotos, onde o termo “plantas desenvolvidas” refere-se a plantas eucariotas. O termo refere-se a plantas inteiras, órgãos vegetais (p.ex.: folhas, caules, raízes, flores, entre outros), sementes, células vegetais, e progênies dos mesmos. Partes das plantas transgênicas também estão incluídas dentro do escopo da invenção compreendendo, por exemplo, células vegetais, protoplastos, tecidos, calos, embriões, bem como flores, óvulos, caules, frutos, folhas, raízes originados de plantas transgênicas ou sua progênie previamente transformada com uma molécula de ADN da invenção e, portanto, consistindo de pelo menos parte das células transgênicas, são também objeto da presente invenção. Os ácidos nucleicos da invenção podem ser utilizados para conferir tratos desejados em essencialmente qualquer planta. Então, a invenção possui uso sobre várias espécies de plantas, incluindo espécies dos gêneros *Anona*, *Arachis*, *Artocarpus*, *Asparagus*, *Atropa*, *Avena*, *Brassica*, *Carica*, *Citrus*, *Citrullus*, *Capsicum*, *Carthamus*, *Cocos*, *Coffea*, *Cucumis*, *Cucurbita*, *Daucus*, *Elaeis*, *Fragaria*, *Glycine*, *Gossypium*, *Helianthus*, *Heterocallis*, *Hordeum*, *Hyoseyamus*, *Lactuca*, *Linum*, *Lolium*, *Lupinus*, *Lycopersicon*, *Malus*, *Manihot*, *Majorana*, *Medicago*, *Nicotiana*, *Olea*, *Oryza*, *Panieum*, *Pannesetum*, *Passiflora*, *Persea*, *Phaseolus*, *Pistachia*, *Pisum*, *Pyrus*, *Prunus*, *Psidium*, *Raphanus*, *Ricinus*, *Secale*, *Senecio*,

*Sinapis, Solanum, Sorghum, Theobromus, Trigonella, Triticum, Vicia, Vitis, Vigna, e Zea.* Particularmente, a presente invenção diz respeito a plantas de algodão transformadas com as seqüências nucleotídicas da presente invenção bem como fragmentos e derivados das mesmas, mais especificamente plantas transformadas de *Gossypium hirsutum*.

5           Protocolos de transformação bem como protocolos para introduzir seqüências de nucleotídeos dentro de plantas podem variar dependendo do tipo de planta ou de célula vegetal, por exemplo, monocotiledôneas ou dicotiledôneas, alvos da transformação. Métodos viáveis de introduzir seqüências nucleotídicas em células vegetais e a subsequente inserção dentro do genoma vegetal são bem descritos no estado da técnica e podem ser, mas  
10 não estão limitados a técnicas tais como eletroporação e microinjeção de protoplastos de células de plantas, ou a construção pode ser introduzida diretamente no tecido vegetal utilizando-se métodos balísticos, tais como bombardeamento de partículas recobertas com ADN.

Técnicas de microinjeção são conhecidas no estado da técnica e bem descritas em  
15 literatura científica e patentária (Zhou, G., Wang, J., Zeng, Y., Huang, J., Qian, S., Liu, G., Introduction of exogenous DNA into cotton embryos. Meth. in Enzymol., 101, 433-448, 1983) (como mencionado no pedido de patente US4743548). A introdução de construções gênicas utilizando-se precipitações de polietileno glicol é descrita em Paszkowski et al. (Paszkowski, J., Shillito, R. D., Saul, M., Mandák, V., Hohn, T. Hohn, B., Potrykus, I.,  
20 Direct gene transfer to plants. Embo J. 3: 2717-2722, 1984) (como mencionado no pedido de patente US20020152501). Técnicas de eletroporação são descritas em Fromm et al (Fromm, M. E., Taylor, L. P. Walbot, V., Expression of genes electroporated into monocot and dicot plant cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:5824, 1985) (como mencionado no pedido de patente US20020152501). Técnicas de transformações balísticas são descritas em  
25 Klein et al (Klein, T. M., Wolf, E. D., Wu, R., Sanford, J. C., High velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. Nature 327:70-73, 1987) (como mencionado no pedido de patente US20020152501).

Alternativamente, as construções gênicas podem ser combinadas com regiões flanqueadoras de T-ADN apropriadas e introduzidas em um vetor convencional, o

hospedeiro *Agrobacterium tumefaciens*. A função de virulência do hospedeiro *Agrobacterium tumefaciens* direcionará a inserção das construções gênicas e marcador adjacente dentro do ADN da célula vegetal quando a célula é infectada pela bactéria. Técnicas de transformação mediadas por *Agrobacterium tumefaciens*, incluindo desarmamento e o uso de vetores binários, são bem descritas na literatura científica (como mencionado no pedido de patente US 20020152501, Horsch, R. B., Fraley, R. T., Rogers, S. G., Sanders, P. R., Lloyd, A., Hoffmann, N. Inheritance of functional foreign genes in plants. Science 233:496-498, 1984; e Fraley, R. T., Rogers, S. G., Horsch, R. B., Sanders, P. R., Flick, J. S., Adams, S. P., Bittner, M. L., Brand, L. A., Fink, C. L., Fry, J. S., Galluppi, G. R., Goldberg, S. B., Hoffmann, N. L., Woo, S. C. Expression of bacterial genes in plant cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:4803, 1983).

Células de plantas transformadas derivadas de qualquer uma das técnicas de transformação descritas acima podem ser cultivadas para regenerar uma planta inteira que possua o genótipo transformado e então o fenótipo desejado, tal como resistência a insetos. Tais técnicas de regeneração contam com a manipulação de certos fitohormônios em meio de crescimento de cultura de tecidos, tipicamente contendo um marcador biocida e/ou herbicida, que deve ser introduzido junto com a seqüência de nucleotídeos desejada. Regeneração de plantas a partir de cultura de protoplastos é descrita em Evans et al (Evans, D. E., and Bravo, J. E., Protoplasts Isolation and Culture, Handbook of Plant Cell Culture, vol. 1, 124-176, MacMillilan Publishing Company, New York, 1983); e Binding 1985 (Binding, H., Regeneration of Plants, Plant Protoplasts, pp. 21-73, CRC Press, Boca Raton, 1985) (como mencionado no pedido de patente US20020152501). A regeneração pode ser também obtida através de calos de planta, explantes, órgãos, ou parte da mesma. Tais técnicas de regeneração são descritas geralmente em Klee et al (Klee, H., Horsch, R., Rogers, S., Agrobacterium-mediated plant transformation and its further applications to plant biology. Ann. Ver. Of Plant Phys. 38:467-486, 1987 (como mencionado no pedido de patente US20020152501).

Um gene codificando uma proteína pesticida da invenção pode ser introduzido por meio de um vetor viável dentro de um hospedeiro microbiano, e o dito hospedeiro pode ser

inserido em plantas ou em animais. O termo “introduzido” no contexto de inserir um ácido nucleico dentro de uma célula significa “transfecção” ou “transformação” ou “transdução” e inclui a incorporação de um ácido nucleico dentro de uma célula procariótica ou eucariótica onde o ácido nucleico pode ser incorporado dentro do genoma da célula (p.ex.: cromossomo, plasmídeo, plastídeo, ou ADN mitocondrial), convertido dentro de um replicon autônomo, ou expresso transientemente (p.ex.: ARNm transfetado).

O termo “microorganismo” é definido aqui como sendo micróbios que possuem organelas funcionais no interior de suas cápsulas ou células como bactérias, protozoários, fungos unicelulares e algas unicelulares.

Existem vários métodos viáveis para introduzir um gene expressando a proteína pesticida dentro de um microorganismo hospedeiro sob condições que permitam a manutenção e a expressão estável do gene. Por exemplo, vetores de expressão podem ser construídos contendo a seqüência nucleotídica de interesse operacionalmente ligada a sinais regulatórios de transcrição e tradução para expressão da seqüência de nucleotídeo. Quando uma seqüência de nucleotídeo homóloga interna do organismo se encontra com a seqüência no vetor binário, poderá haver uma recombinação entre elas e o gene que codifica a proteína pesticida se integrará no genoma do organismo hospedeiro de forma estável.

Células hospedeiras viáveis, onde as células contendo a proteína inseticida serão tratadas para prolongar a atividade da proteína inseticida na célula quando a célula tratada for aplicada no meio ambiente da praga alvo, pode incluir procariotos ou eucariotos, normalmente sendo limitadas àquelas células que não produzem substâncias tóxicas em organismos superiores. No entanto, organismos que produzem substâncias tóxicas em organismos superiores podem ser usados, onde a toxina for instável ou o nível de aplicação suficientemente baixo para evitar qualquer possibilidade de toxicidade a hospedeiros mamíferos. Particularmente os hospedeiros são procariotas e eucariotas menos desenvolvidos como os fungos. Exemplos de procariotos, ambos gram negativos e gram positivos, incluem, mas não estão limitados a *Enterobacteriaceae*, tais como *Escherichia*, *Erwinia*, *Shigella*, *Salmonella*, e *Proteus*; *Bacillaceae*; *Rhizobiceae*, tais como *Rhizobium*; *Spirillaceae*, tais como *Photobacterium*, *Zymomonas*, *Serratia*, *Aeromonas*, *Vibrio*,

*Desulfovibrio*, *Spirillum*; *Lactobacillaceae*; *Pseudomonadaceae*, tais como *Pseudomonas* e *Acetobacter*; *Azotobacteraceae* e *Nitrobacteraceae*. Entre os eucariotos podem ser exemplificados os fungos, tais como *Phycomycetes* e *Ascomycetes*, os quais incluem leveduras, tais como *Saccharomyces* e *Schizosaccharomyces*; e *Basidiomycetes*, tais como

5 *Rhodotorula*, *Aureobasidium*, *Sporobolomyces*, e semelhantes.

Características de interesse particular na seleção de uma célula hospedeira para o propósito de produzir a proteína inseticida incluem a facilidade de introdução do gene da proteína inseticida dentro do sistema de expressão, eficiência de expressão, estabilidade da proteína no hospedeiro, e a presença de capacidades genéticas auxiliares.

10 Organismos hospedeiros de particular interesse incluem leveduras, tais como *Rhodotorula spp.*, *Aureobasidium spp.*, *Saccharomyces spp.*, e *Sporobolomyces spp.*, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus thuringiensis*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, e outros semelhantes.

As concretizações da presente invenção podem ser efetivas contra uma variedade de

15 pragas. Para os propósitos da presente invenção, as pragas incluem, mas não estão limitadas a, insetos, fungos, bactérias, nematóides, ácaros, patógenos protozoários, parasitas animais, e semelhantes. Pragas de particular interesse são insetos-praga, particularmente insetos-praga que causam danos significativos para plantas agrícolas. Entende-se como “insetos-praga” insetos e outras pragas similares tais como, por exemplo, os insetos das ordens

20 Diptera, Hymenoptera, Lepidoptera, Mallophaga, Homoptera, Hemiptera, Orthoptera, Thysanoptera, Dermaptera, Isoptera, Anoplura, Siphonaptera, Trichoptera, etc., particularmente Coleoptera, especialmente *Anthonomus grandis*, *Diabrotica virgifera* e *Lepidoptera*. Insetos-praga da presente invenção da maioria das cultivares incluem, mas não estão limitadas a Milho: *Ostrinia nubilalis*, *Agrotis ipsilon*, *Helicoverpa zea*, *Spodoptera*

25 *frugiperda*, *Diatraea grandiosella*, *Elasmopalpus lignosellus*, *Diatraea saccharalis*, *Diabrotica virgifera virgifera*, *Diabrotica longicornis barberi*, *Diabrotica undecimpunctata howardi*, *Melanotus spp.*, *Cyclocephala borealis*, *Cyclocephala immaculata*, *Popillia japonica*, *Chaetocnema pulicaria*, *Sphenophorus maidis*, *Rhopalosiphum maidis*, *Anuraphis maidiradicis*, *Blissus leucopterus leucopterus*,

*Melanoplus femurrubrum*, *Melanoplus sanguinipes*, *Hylemya platura*, *Agromyza parvicornis*, *Anaphothrips obscurus*, *Solenopsis milesta*, *Tetranychus urticae*; Sorgo: *Chilo partellus*, *Spodoptera frugiperda*, *Helicoverpa zea*, *Elasmopalpus lignosellus*, *Feltia subterranea*, *Phyllophaga crinita*, *Eleodes*, *Conoderus*, e *Aeolus spp.*, *Oulema melanopus*,  
5 *Chaetocnema pulicaria*, *Sphenophorus maidis*, *Rhopalosiphum maidis*, *Sipha flava*, *Blissus leucopterus leucopterus*, *Contarinia sorghicola*, *Tetranychus cinnabarinus*, *Tetranychus urticae*; Trigo: *Pseudaletia unipunctata*, *Spodoptera frugiperda*, *Elasmopalpus lignosellus*, *Agrotis orthogonia*, *Elasmopalpus lignosellus*, *Oulema melanopus*, *Hypera punctata*, *Diabrotica undecimpunctata howardi*, *Schizaphis graminum*, *Macrosiphum avenae*,  
10 *Melanoplus femurrubrum*, *Melanoplus differentialis*, *Melanoplus sanguinipes*, *Mayetiola destructor*, *Sitodiplosis mosellana*, *Meromyza americana*, *Hylemya coarctata*, *Frankliniella fusca*, *Cephus cinctus*, *Aceria tulipae*; Girassol: *Cylindrocapturus adpersus*, *Smicronyx fulus*, *Smicronyx sordidus*, *Suleima helianthana*, *Homoeosoma electellum*, *Zygogramma exclamationis*, *Bothyrus gibbosus*, *Neolasioptera murtfeldtiana*; Algodão: *Heliothis virescens*, lagarta-das-maçãs; *Helicoverpa zea*, lagarta da espiga do milho; *Spodoptera exigua*, lagarta do cartucho; *Pectinophora gossypiella*, lagarta rosada; *Anthonomus grandis*, bicudo-do-algodoeiro; *Aphis gossypii*, pulgão-do-algodoeiro; *Pseudatomoscelis seriatus*, pulga saltadora do algodão; *Trialeurodes abutilonea*, mosca branca *Bemisia tabaci*; *Melanoplus femurrubrum*, gafanhoto; *Melanoplus differentialis*, gafanhoto; *Thrips tabaci*,  
20 tripes-do-fumo; *Frankliniella fusca*, tripes; *Tetranychus cinnabarinus*, ácaro vermelho; *Tetranychus urticae*, ácaro-rajado; Arroz: *Diatraea saccharalis*, *Spodoptera frugiperda*, *Helicoverpa zea*, *Colaspis brunnea*, *Lissorhoptrus oryzophilus*, *Sitophilus oryzae*, *Nephotettix nigropictus*, *Blissus leucopterus leucopterus*, *Acrosternum hilare*; Soja: *Pseudoplusia includens*, *Anticarsia gemmatalis*, *Plathypena scabra*, *Ostrinia nubilalis*,  
25 *Agrotis ipsilon*, *Spodoptera exigua*, *Heliothis virescens*, *Helicoverpa zea*, *Epilachna varivestis*, *Myzus persicae*, *Empoasca fabae*, *Acrosternum hilare*, *Melanoplus femurrubrum*, *Melanoplus differentialis*, *Hylemya platura*, *Sericothrips variabilis*, *Thrips tabaci*, *Tetranychus turkestanii*, *Tetranychus urticae*; Cevada: *Ostrinia nubilalis*, *Agrotis ipsilon*, *Schizaphis graminum*, *Blissus leucopterus leucopterus*; *Acrosternum hilare*,

*Euschistus servus*, *Jylemya platura*, *Mayetiola destructor*, *Petrobia latens*; Canola: *Vrevicoryne brassicae*, *Phyllotreta cruciferae*, *Phyllotreta striolata*, *Phyllotreta nemorum*, *Meligethes aeneus*, *Meligethes rufimanus*, *Meligethes nigrescens*, *Meligethes canadianus*, e *Meligethes viridescens*; Batata, *Leptinotarsa decemlineata* e Feijão: *Zabrotes subfasciatus*;  
5 *Calosobruchus spp.*, *Acanthoscelides obtectus*.

Os exemplos abaixo são colocados de forma a ilustrar e elucidar melhor a invenção e não podem ser tidos como forma de limitar a presente invenção.

### **EXEMPLOS**

Técnicas usuais de biologia molecular (p.ex.: transformação de bactérias e  
10 eletroforese em gel de agarose de ácidos nucleicos) estão descritas por meio de termos  
comumente empregados. Detalhes da prática de tais técnicas são descritos em Sambrook *et al* (Sambrook, J., Russell, D. W., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold  
Spring Harbor Laboratory Press. 1989).

**Exemplo 1** – Extração, purificação e caracterização enzimática das alfa-amilases de larvas  
15 do bicudo do algodoeiro.

As alfa-amilases das larvas do bicudo do algodoeiro foram obtidas para uso na  
seleção de genes afins, partindo de uma biblioteca combiantória de genes variantes de  
inibidores de alfa-amilases.

Larvas do terceiro instar cultivadas em dieta artificial foram maceradas em 500 µL de  
20 solução de extração (10 µM de E-64 e 5 µg/mL pepstatina A) e centrifugada a 10.000g, 4°C, 30  
min. O sobrenadante foi coletado e filtrado utilizando filtro de 0.45 µm. O extrato protéico foi  
quantificado como descrito por Bradford (Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for  
the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye  
binding. Analytical Biochemical, 72:248–254. 1976.) O extrato total foi submetido a  
25 cromatografia hidrofóbica utilizando-se a resina Phenyl sepharose CL 4B, fabricada pela  
Amershan®. A resina foi pré-equibrada com Tampão E (10 mM de imidazole pH 6.0, 1M de

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). A amostra protéica foi aplicada e em seguida, as proteínas não ligantes foram lavadas com o tampão E. As proteínas adsorvidas à resina foram eluídas utilizando um gradiente linear de 1M de sulfato de amônio (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 0 M, em frações de 1mL (fluxo 1mL.min<sup>-1</sup>) e absorvância foi medida em 280 nm. As frações coletadas foram analisadas em ensaio in vitro quanto a presença de atividade amilolítica. Uma alíquota (2μL) de cada fração foi incubada por 30 min a 25°C com 68 μL de tampão de atividade (50 mM de fosfato de sódio pH 5.8, 200 mM de NaCl, 0.1 mM de CaCl<sub>2</sub>) e 30 μL de solução de amido 0.125% (p/v), solubilizado no mesmo tampão. A atividade amilolítica foi detectada após a adição de 140 μL de solução de iodo (0.01% de tintura de iodo comercial, 125 mM de HCl) e mensurada pela absorvância em 630 nm. As frações apresentando atividade amilolítica (eluídas na faixa entre 0,2167 a 0 M de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) (Figura 1) foram agrupadas, dialisadas contra água e concentradas a vácuo. Após análise da pureza utilizando eletroforese em gel 12% SDS-PAGE (Lammeli U.K., Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature 227: 680-685,1970)(Figura 2)atividade amilolíticas das proteínas, semi-purificadas na cromatografia hidrofóbica, foi confirmada pela aplicação em zimograma. Após a separação das proteínas na eletroforese o gel foi incubado por 1h em solução 2.5% de TritonX-100 (v/v) em temperatura ambiente, para renaturação das alfa-amilases. Seguiu-se com incubação em tampão de atividade (descrito acima), por 4h, 37°C e coloração com solução de iodo. As bandas indicando atividade amilolítica se destacaram devido sua cor branca no gel corado de azul (Figura 2b).

**Exemplo 2** – Geração de genes mutantes eficazes no controle de *A. grandis*, produzidos a partir da mistura e recombinação dos genes  $\alpha AI-1$  e  $\alpha AI-2$  nativos, pela aplicação da técnica de embaralhamento de ADN.

A construção de biblioteca de genes recombinantes análogos aos genes  $\alpha AII-1$  e  $\alpha AI-2$ , provenientes de feijão, é uma importante estratégia biotecnológica, contribuindo de modo importante em programas de melhoramento de plantas, via transformação genética para geração de transgênicos. Esta tecnologia disponibiliza uma variedade de novas moléculas com potencial uso na transformação de plantas visando o controle do inseto-alvo, bem como a melhoria da atividade inseticida de novas proteínas codificadas pelos genes recombinantes. Este fator torna-se ainda mais relevante quando levamos em consideração

os baixos níveis de expressão destas proteínas heterólogas em plantas geneticamente transformadas.

Uma vez identificado a presença de grãos de amido nas estruturas reprodutivas do botão floral da planta de algodão, local preferido para alimentação pelo inseto-praga *A. grandis*, e também evidenciado a presença de duas formas da enzima alfa-amilase, super expressas, nas larvas do inseto, partiu-se para a estratégia de obtenção *in vitro* de novos genes, análogos aos genes  $\alpha AI-1$  e  $\alpha AI-2$ , codificadores para inibidores de alfa-amilases. Para isso, os genes nativos *aa1-1* e *aa1-2* foram individualmente amplificados por PCR com oligonucleotídeos específicos para seqüência gênica em questão, os quais contêm a seqüência da enzima de restrição *SfiI* (5'GGCCNN NNNGGCC3'). Estes oligonucleotídeos foram desenhados em nosso laboratório utilizando-se como molde as seqüências gênicas nativas  $\alpha AI-1$  (Genbank: EF087992.1) e  $\alpha AI-2$  (Genbank: D26109 e AJ439565) e introduzem às extremidade 5'e 3' dos genes nativos a seqüência da enzima em questão (oligonucleotídeos senso *SfiIA11F*- 5' CCGGCCCCAGGCGGCCGCCACCGAAACCTC 3' e *SfiIA12F* CCGGCCCCAGGCGGCCGCCAGCGACACCTC 3' e oligonucleotídeos anti-senso *SfiIA1R* 5'CCGGCCGGCCTGGCCGAGGATCTTGTTGAG 3' e *SfiIA2R* 5' CCGGCCGGCCTGGCCGAGGATATTGTTGAG 3' são utilizados em uma reação de PCR com volume final de 50  $\mu$ L, contendo 375 nM de cada oligonucleotídeo específico, 200 nM de dNTPs, 1 X do tampão para a enzima *taq (Pfu)*(Promega), 3 U de ADN polimerase *taq (Pfu)*(Promega) e 400 ng de cada ADN *aa1-1* e *aa1-2* em seus vetores originais. A amplificação foi realizada em termociclador (Mastercycler Gradient – Eppendorf) sob as seguintes condições: desnaturação prévia a 95 °C por 5 minuto, uma repetição de 29 ciclos a 95°C por 45 segundos (desnaturação); 55°C por 45 segundos (anelamento dos oligonucleotídeos) e 72°C por 90 segundos (extensão da ADN polimerase) e ao final uma extensão 72 °C por 10 minutos.

A reação gerou produto de 660pb (pares de base), o qual foi submetido a uma eletroforese em gel de agarose 1%, a 100 Volts por 90 minutos. O fragmento gênico foi excisado e eluído do gel de agarose utilizando-se o kit GeneClean® II (Qbiogene).

Seguindo o protocolo da técnica de embaralhamento de ADN descrito por Stemmer, W.P.C.et al., (Stemmer, W. P. C. Rapid evolution of a protein in vitro By Embaralhamento de ADN. Nature. London, 370:389 -391, 1994) e Zhao&Arnold (Zhao, H. and Arnold, F.H. Functional and nonfunctional mutations distinguished by random recombination of homologous genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 94:7997 – 8000, 1997), foi realizada a digestão com a nuclease DNase I da mistura contendo 5µg de cada novo produto de ADN (*SfiI*/*αai-1/SfiI* e *SfiI*/*αai-2/SfiI*) amplificado por PCR e purificado do gel de agarose. A reação da mistura liofilizada foi conduzida em 80 µL de tampão da enzima (50 mM tris pH 7.5, 1mM MnCl<sub>2</sub>, 0.1mg/mL de BSA) com 0.03 U da enzima DNase I (Figura 3: etapas I e II) e interrompida pela adição de 250 mM de EDTA (Ácido 4-acético 2-amino etileno). Após esta etapa, o produto gênico é completamente fragmentado gerando pedaços gênicos de 50 a 300 pb (Figura 4.2 )os quais foram purificados do gel 2,5% agarose utilizando coluna do Kit PCR Purification<sup>®</sup> (Qiagen). Os fragmentos purificados foram utilizados em uma reação de PCR, a qual seguiu as seguintes condições: 10µL do produto puro digerido com DNase I, 1 X do Tampão *Taq Pfu*, 0,4 mM de dNTPs, 0,1 U de *Taq Pfu* (Promega), totalizando 25µL. A reação de PCR foi realizada em termociclador (Mastercycler Gradient – Eppendorf) sob as seguintes condições: desnaturação prévia a 95°C por 2 minutos, uma repetição de 43 ciclos a 95°C por 1 minuto (desnaturação); 55°C por 1 minuto (anelamento dos fragmentos) e 72°C por 1 minuto com acréscimo de 5 segundo por ciclo (extensão da ADN polimerase) e ao final uma extensão 72°C por 7 minutos.

Esta reação de embaralhamento de ADN é conduzida sem a adição de oligonucleotídeos, o que gera ao final um montante de fragmentos de tamanhos variados (Figura 4.3). Este novo produto é então, utilizado na segunda reação de PCR como molde, nas seguintes condições: 6% do volume do produto da primeira reação (molde), 1X do Tampão *Taq Platinum*, 0,2 mM dNTPs, 0,8 µM dos oligonucleotídeos específicos *SfiI* F e *SfiI* R, e 2,5 U na mistura de 1:1(v/v) *Taq Pfu*(Promega)/*Taq* ADN polimerase (Invitrogen). A reação de amplificação foi realizada em termociclador (Mastercycler Gradient – Eppendorf) sob as seguintes condições: desnaturação prévia a 95°C por 2 minutos, uma repetição de 10 ciclos a 95°C por 30 segundos (desnaturação); 55°C por 30 segundos

(anelamento dos fragmentos), 72°C por 45 segundos (extensão da ADN polimerase), outra repetição de 14 ciclos a 95°C por 30 segundos (desnaturação), 55°C por 30 segundos (anelamento do produto), 72°C por 45 segundos (extensão da ADN polimerase) com acréscimo de 20 segundos por ciclo e ao final uma extensão 72°C por 7 minutos.

5            Sendo assim, o gene original é reconstituído com modificações em sua estrutura nucleotídica, seja pela introdução, deleção ou substituição de nucleotídeos. Este produto final, reconstruído foi submetido a uma eletroforese em gel de agarose 1%, a 100 Volts por 90 minutos, excisado e eluído do gel com o Kit GeneClean® II (Qbiogene) (Figura 4.4). O produto purificado, aproximadamente 1µg, foi então digerido com a enzima de restrição *Sfi*I  
10        por 16 h a 50°C e submetido a uma eletroforese em gel de agarose 1% , a 100 Volts por 90 minutos. A banda no tamanho aproximado do gene original sem o sequencia sinal (aproximadamente 660 pb) foi excisada do gel e o ADN eluído pelo GeneClean® II Kit (Qbiogene) (Figura 4.4).

          O produto final (população de genes recombinados) com adaptadores específicos  
15        torna-se apto à clonagem no vetor pCOMB3X (Andris-Widhopf, J.; Rader, C.; Steinberger, P.; Fuller, R., Barbas III, C. F. Methods for the generation of chicken monoclonal antibody fragments by Phage display. Journal of Immunological Methods, 242: 159-181, 2000). Assim, os novos genes reconstruídos (análogos aos genes parentais  $\alpha AI-1$  e  $\alpha AI-2$ ) foram clonados no vetor com auxílio da enzima T4 ADN Ligase® (Invitrogen) e este utilizado para  
20        transformar células de *Escherichia coli* XL1-Blue® (Stratagene), via eletroporação, nas seguintes condições: capacitância 25 uFD, resistência 200  $\Omega$ , voltagem 2,5 KVolts. Os transformantes foram então semeados em placas contendo meio de cultura Luria-Bertani Agar e Carbenicilina USB (100 µg/ mL). Após 17 horas a 37°C as colônias crescidas separadamente em meio seletivo indicam o título da biblioteca contendo 10<sup>7</sup>  
25        transformantes.

          Esta biblioteca de análogos de  $\alpha AIs$  gerada por embaralhamento de ADN e fusionados a proteína III do capsídeo do fago filamentoso M13 (fagos de fusão) foi então selecionada pela técnica de apresentação de proteínas na superfície de bacteriófagos - *Phage Display* (Barbas III, C. F.; Burton, D. R., Scott, J. K., Silverman, G. J. Selection from antibody

libraries. In: Phage display – A Laboratory Manual – USA: Cold Spring Laboratory, 10.1 – 10.20, 2001) utilizando como ligantes alfa-amilases de *A. grandis* (Francis, B. R., Maaty, W. S. A., Bulla- Jr, L. A. Effects of Midgut-Protein-Preparative and Ligand Binding Procedures on the Toxin Binding Characteristics of BT-R1, a Common High-Affinity Receptor in *Manduca sexta* for Cry1A *Bacillus thuringiensis* Toxins. Applied and Environmental Microbiology. June 1998, Vol. 64, No. 6, p. 2158–2165).

O cultivo de células de *E. coli* XL1-Blue transformadas, em meio SB contendo 100µg mL<sup>-1</sup> carbenicilina, 5µg mL<sup>-1</sup> tetraciclina, foi incubado em 37°C com agitação até atingir densidade óptica  $A_{550} = 0.6-0.8$ . Então,  $1 \times 10^{12}$  pfu mL<sup>-1</sup> do fago auxiliar (VCSM13® Stratagene) foi adicionado para produzir fagos de fusão contendo os análogos do *aa*is, incubados por 2 h a 37°C. Adicionou-se Canamicina 100µg mL<sup>-1</sup> e a incubação seguiu por 12 h a 37°C. As células coletadas por centrifugação foram guardadas a -20°C para posterior preparação de ADN. Os fagos de fusão foram precipitados com PEG-8000 (4% p/v) durante 30 minutos no gelo e após centrifugação ressuspensos em 2 mL of 1% (p/v) ASB (Albumina de Soro Bovino) em solução salina. Coletados após centrifugação a preparação de fagos de fusão é utilizada nos ciclos de seleção.

No procedimento de seleção por afinidade de ligação, os fagos fusionados foram depositados em poços de uma placa de microtitulação previamente sensibilizados com alfa-amilases de *A. grandis* (100 µg), extraídas da membrana do intestino de larvas do bicudo do algodoeiro. A cada ciclo de seleção, os poços são lavados com solução PBS-Tween (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 12mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 0.05% Tween 20®) e, os fagos específicos eluídos em baixo pH, são usados para transfectar novas células de *E. coli*. As partículas de fagos amplificadas são utilizadas no sucessivo ciclo de seleção. O procedimento envolveu cinco ciclos de lavagem, eluição e amplificação. A titulação das colônias coletadas em cada ciclo é feita pelo plaqueamento de colônias em diluições seriadas em meio SB-agar contendo carbenicilina 100 µg mL<sup>-1</sup>. As colônias isoladas do montante de fagos específicos eluídos no terceiro ciclo de seleção (apresentando o maior título e, portanto, o ciclo de enriquecimento de fagos específicos) (Figura 5) foram amplificadas com oligonucleotídeos específicos para os genes *aa*is. Colônias mostrando amplificação em PCR e contendo

aproximadamente 600 pb (tamanho dos genes parentais) foram selecionadas para a expressão em *E. coli* linhagem Top 10 F'.

Os genes originais e os genes análogos selecionados no terceiro ciclo de seleção foram usados para transformar *E. coli*. O produto da transformação foi plaqueado em meio LB-agar com ampicilina 100 µg mL<sup>-1</sup> e crescido a 37°C por 16 h. A integridade os genes foi determinada por PCR e 86 clones contendo o gene inteiro foram pré-inoculados em meio 2xYT seletivo (1% Extrato de Levedura, 1,6% peptona, 1,0% NaCl, pH 7.0 contendo 0,5% glicose e ampicilina 100 µg mL<sup>-1</sup>) em placa de 96 poços de 2mL, com incubação de 16 h a 37°C e 220 rpm (rotação por minutos). Em seguida, 10 µL dos inóculos foram incubados em 1 mL de meio SB (1%MOPS, 3% triptona, 2% extrato de levedura, pH 7.0 com ampicilina 100 µg mL<sup>-1</sup>) a 37°C, 220 rpm (rotação por minuto) até Abs<sub>600nm</sub> entre 0,6-0,8. A expressão foi induzida pela adição de 1 mM de IPTG (β-tio-galactosideo) com incubação de 12 hs, 30°C, 200 rpm. O cultivo foi centrifugado e o sobrenadante coletado mantido em 4°C, usado no *dot blot*.

Para análise de expressão dos 86 clones (*dot blot*), alíquota da preparação (sobrenadante) foi depositada diretamente sobre membrana de nitrocelulose (Hybond C<sup>®</sup> Amersham) e esta hibridizada contra anticorpo primário anti-HA (hemaglutinina) (Santa Cruz Biotechnology), seguida de incubação com anti-IgG produzido em coelho (Sigma) e conjugado a fosfatase alcalina. Os sinais de expressão foram detectados após revelação com NBT (Nitro Blue Tetrazole)/BCIP (5'-bromo-4-cloroindolil-fosfato<sup>®</sup> - Roche). Foram identificados 31 clones expressos pelo procedimento e a sequência de 26 clones foram determinadas por reação de seqüenciamento nas seguintes condições: 400-800 ng de ADN plasmidial contendo os análogos e 4 pM de oligonucleotídeos específicos (*Sfi*IAIsR e *Sfi*IAIsF) em um seqüenciador automático modelo 3130 xL Genetic Analyzer (APPLIED BIOSYSTEMS).

O alinhamento múltiplo das 26 seqüências dos clones análogos foi realizado com as seqüências dos genes *αAIs* originais pelo CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>) (Larkin, MA; Blackshields, G; Brown, NP; Chenna, R; McGettigan, PA; McWilliam, H; Valentin, F; Wallace, IM; Wilm, A; Lopez, R;

Thompson, JD; Gibson, TJ; Higgins, DG. ClustalW and ClustalX version 2. Bioinformatics. 2007;23:2947–2948. doi: 10.1093/bioinformatics/btm404) – O perfil de recombinação (distribuição das mutações) (Figura 6 e Figura 7) determinado para os análogos selecionados pode ser classificado em 3 grupos distintos: em 17 dos análogos mutantes, as mutações de resíduos de aminoácidos foram na maioria idênticas a sequencia do  $\alpha$ AI-1 e em 3 outros, na maioria idêntico a sequencia do  $\alpha$ AI-2, ambos em mais de 65% das posições. Seis dos mutantes selecionados mostraram entre 40-60% de identidade de sequencia nas posições relativas ao  $\alpha$ AI-1 e  $\alpha$ AI-2. Foram identificadas duas seqüências repetidas para dois dos clones selecionados e um em outro caso, a mesma seqüência em 3 dos análogos mutantes selecionados.

**Exemplo 3** – Construção de vetores de expressão em plantas modelo contendo variantes de inibidores de alfa-amilase e obtenção das proteínas recombinantes na forma ativa

Os inibidores de alfa-amilases do tipo dos isolados de feijão ( $\alpha$ AI-1 e  $\alpha$ AI-2) se tornam ativos após receberam as modificações pós-traducional, sendo a forma heterotetramérica contendo duas subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  (9 e 14 kDa, respectivamente) que interagem entre si. Esta modificação envolve uma proteólise no resíduo Asn77 por uma protease Asn-específica e remoção do resíduo Asn79 por uma carboxipeptidase. Em acréscimo ocorre a remoção de 19 resíduos localizados no c-terminal da subunidade  $\beta$  (Young, N.M.; Thibault, P., Watson, D.C.; Chrispeels, M.J. Post translational processing of two alpha-amylase inhibitors and an arcelin from the common bean, *P. vulgaris*. FEBS Letters, 5: 203-20, 1999). É conhecido que plantas de fumo e algumas leguminosas realizam este processamento de forma eficiente originando moléculas ativas (Silva, M.C.M.; Mello, L.V.; Coutinho, M.V.; Rigden, D.J.; Neshich, G.; Chrispeels, M.J.; Grossi-de-Sá, M.F. Mutants of common bean alpha-amylase inhibitor-2 as an approach to investigate binding specificity to alpha-amylases. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 39:201-208, 2004.)

Para expressão das proteínas heterólogas foi utilizado o vetor binário de expressão em plantas pCambia2300 fornecido por Cambia, Camberra (Austrália). Inicialmente, o vetor foi modificado para receber o cassete de expressão contendo: o promotor 35S do vírus do mosaico da couver-flor duplicado (CamV35Sd), o “potencializador” AMV do vírus do mosaico da alfafa e o terminador NOS (Nopalina sintase), inserido entre os sítios de restrição *EcoR* I e *Hind* III (Figura 8). Para amplificar via PCR os insertos (variantes de inibidores de alfa-amilases) clonados no fagomídeo pComb3X foram desenhados oligonucleotídeos sendo o de orientação senso: XmaPSAI-1 contendo sítio de restrição Xma I, peptídeo sinal do  $\alpha$ AI-1 e região 5'(5'CCCCCGGGATGGCTTCCTCCAACCTTACTCTCCCTAGCCCTCTTCCTTGTGCTTCTCAACCACGCAAACCTCAGCCACCGAAACCTCC 3') e o anti-senso, AI-2SacI, composto pelo sítio de restrição Sac I e códon de terminação (5'CCCGAGCTCTTAGAGGATCTTGTTGAGGAC 3'). Estes oligonucleotídeos foram então utilizados em uma reação de PCR com volume final de 50  $\mu$ L, contendo 300 nM de cada oligonucleotídeo, 240  $\mu$ M de dNTPs, 1 X do tampão para a enzima Taq polimerase (Invitrogen), 2,5 U de ADN polimerase Taq (Invitrogen) e 200 ng dos genes variantes de *aaais* clonados no vetor pComb3X. A amplificação foi realizada em termociclador (Mastercycler Gradient – Eppendorf) sob as seguintes condições: desnaturação prévia a 94°C por 2 minutos uma repetição de 25 ciclos a 94°C por 45 segundos (desnaturação); 50°C por 45 segundos (anelamento dos oligonucleotídeos) e 72°C por 45 segundos (Extensão da ADN polimerase) e ao final uma extensão 72°C por 5 minutos.

O produto gerado purificado do gel de agarose, após eletroforese, e digerido com as enzimas *Xma* I e *Sac* I foi então, submetido a uma reação de ligação nas seguintes condições: 30 ng do inserto, 100 ng do vetor (pCambia 2300 modificado – Figura 8) e 1 U de T4 ADN ligase no tampão da enzima (Invitrogen). A mistura foi incubada à temperatura de 16°C, por 16h. Células quimicamente competentes de *E. coli* XL-1 Blue foram transformadas com 3  $\mu$ L do sistema de ligação por eletroporação. Para este procedimento, os 30 ng de ADN foram misturados a 40  $\mu$ L de células competentes e a mistura incubada foi transformada via eletroporação com as condições de capacitância 25 uFD, resistência

200  $\Omega$ , voltagem 2,5 KVolts. As células foram imediatamente coletadas com 1 mL de meio Luria-Bertani e incubadas 37 °C por 1h. Posteriormente, as células foram inoculadas em 10 mL de meio de cultura Luria-Bertani ágar contendo 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de canamicina e crescidas durante 16 h, a 37 °C. Para verificação de clones positivos foi realizada uma PCR  
5 de colônia, a qual utilizou como molde o ADN das bactérias transformadas e as mesmas condições descritas para a clonagem dos genes. Os clones positivos foram então, inoculados em 5 mL de meio Luria-Bertani ágar contendo ampicilina 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Os ADNs foram preparados e as seqüências determinadas para confirmação da clonagem contendo correta fase aberta de leitura.

10 Para expressão dos novos genes em plantas de Arabidopsis, os plasmídeos gerados (pFSpl2300AIC3 - número ATCC PTA11586; pFSpl2300AIG4 - número ATCC PTA11584 e pFSpl2300AIA11 - número ATCC PTA11585) foram utilizados para transformar células de *Agrobacterium tumefaciens* linhagem GV3101(pMP90) (Konz, C.; Schell, J. The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes  
15 carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. Molecular and general genetics 204: 382-396.1986) por choque térmico. Foi adicionado 1  $\mu\text{g}$  do DNA dos vetores *pCambia2300/Aismut* (Figura 8) em 100  $\mu\text{L}$  de células competentes e a mistura incubada em gelo por 30 minutos, seguida de solidificação utilizando Nitrogênio líquido. O choque térmico foi realizado por 5 minutos a 37°C e as células homogenizadas com 1 mL de meio LB (Luria-Bertoli) pré-aquecido a 37°C.  
20 Após incubação de 2 h a 37°C, 50  $\mu\text{L}$  foram plaqueados em LB-agar contendo Rifampicina 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; gentamicina 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e canamicina 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e as colônias crescidas a 28°C, por 24-48 h. Os transformantes positivos foram confirmados por amplificação do DNA em PCRs utilizando os oligonucleotídeos iniciadores XmaPSAI-1 e AI-2SacI (acima descritos) nas condições de 95°C por 5 min, seguido de 30 ciclos de 95°C por 45 seg, 55°C por 45 seg e 72°C por 90 seg, com  
25 extensão de 72°C por 10 min . A colônia do transformante foi crescida em 2 mL de LB-canamicina (50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) a 28 °C com 200 rpm de agitação durante 48 h. Este pré-inóculo foi adicionado a 200 mL de LB-canamicina (50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e o cultivo agitado em 200 rpm a 28 °C, até atingir a OD<sub>600nm</sub> entre 0.8-1.5. Após centrifugação a 1500 g, por 20 min., o precipitado foi ressuscitado em 200  
30 mL de meio de infiltração (0,22% de sais MS (Murashige & Skoog- Murashige, T.; Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiol Plant.

15:473–497, 1962.)) MES (ácido 2- (N-morfolino etanosulfônico) 0.5M, 5% de sacarose (p/v) e 0.2% de Silwet L-77, pH 5.7). Esta solução foi utilizada para infiltrar os botões florais ainda fechados de 3 a 5 plantas de *Arabidopsis*, seguindo o procedimento descrito por Clough & Bent (S. J. Clough, S. J.; A. Bent, A. F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium* -mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal.*, 16:735-743, 1998. Sementes maduras coletadas das plantas transformadas foram desinfetadas (5 min em Etanol 70% adicionado de 0.1% de Triton X-100) e semeadas em meio MS 25%, 0.8% de agar contendo canamicina 100 µg mL<sup>-1</sup>. Plântulas resistentes ao meio seletivo foram transferidas e desenvolvidas no solo e as folhas coletadas e utilizadas para a caracterização molecular dos transformantes. Com intuito de extrair o DNA, uma folha da planta foi macerada em 300 µL de tampão EB (Tris 200 mM, EDTA 25 mM, NaCl 250 mM, SDS 0,5%) e 100 µL de Clorofórmio, seguida de forte agitação por 1 min. Após centrifugação, a 11.000 g por 5 min, a fase superior foi coletada e o DNA precipitado com igual volume de Isopropanol. O precipitado foi lavado com etanol 70% e o precipitado seco foi ressuscitado em 100 µL de água. Para identificação da presença dos genes variantes nas plantas de *Arabidopsis*, 3µL dos DNAs extraídos foram utilizados como molde em PCRs, contendo os oligonucleotídeos XmaPSAI-1 e AI-2SacI, para o volume final de 15 µL, na seguinte condição: 95°C por 5 min, seguido de 30 ciclos de 95°C por 45 seg, 55°C por 45 seg e 72°C por 90 seg, com extensão de 72°C por 10 min.

As plantas mostrando amplificação do gene nas análises de PCR foram analisadas quanto a expressão protéica, utilizando as técnicas de *Western Blot* e ELISA. Obteve-se extratos proteicos partindo de tres a quatro folhas de plantas da geração T2 maceradas em Nitrogênio líquido. O pó foi ressuscitado em tampão de extração (125 mM Tris-HCl pH 8.8.; 0.1% SDS, 10% glicerol e 50 mM metabissulfito de sódio) e após centrifugação (9000 g por 10 min) o sobrenadante (extrato proteico) foi coletado e a concentração determinada pelo método de Bradford (Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemical*, 72:248–254. 1976.). Trinta e cinco microgramas do extrato protéico foram separados em eletroforese SDS-PAGE 15% (Lammeli U.K., Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685,1970) e as proteínas transferidas para membrana de nitrocelulose (Hybond C<sup>®</sup> Amersham). Após o

bloqueio em solução de gelatina 3% em TBS por 16 h em temperatura ambiente, a membrana foi incubada com anticorpo anti- $\alpha$ AI-1 produzido em coelho na diluição de 1:700 utilizando TBS contendo 1% gelatina, durante 4 h, temperatura ambiente, sob agitação leve. Seguiu-se com três lavagens de 15 min sob agitação utilizando solução TBS-T (TBS adicionado de 0.05% de Tween-20) e posterior incubação por 2 h com anticorpo secundário: anti IgG conjugado a enzima peroxidase (BioRad) produzido em coelho e diluído 1000 vezes em TBS. Novamente, seguiram 3 lavagens de 5 min cada, utilizando TBS-T e então, as proteínas foram detectadas após a incubação da membrana em solução de revelação composta da mistura da solução A (9 mg de HRP (Horseradish peroxidase) dissolvido em 3 mL de metanol gelado e da solução B (12 mL de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) adicionado em 15 mL de TBS). A figura 9 mostra a detecção da proteínas análogas recombinante representada em duas subunidades:  $\alpha$  e  $\beta$  (9 kDa e 14 kDa, respectivamente), indicando o correto processamento das proteínas inibitórias de alfa-amilases.

As proteínas recombinantes foram quantificadas por ELISA, sensibilizando poços de uma placa de microtitulação com 150  $\mu$ g de extrato protéico, por 2h a 37°C. Após sensibilização dos poços e descarte do extrato protéico os sítios inespecíficos foram bloqueados com 200  $\mu$ L de solução (3% BSA (Albumina de Soro Bovino) dissolvido em solução TBS-T (solução TBS contendo 0.05% de Tween-20) durante 16 h a 4°C, com acréscimo de 1 h a 37°C. Os poços foram lavados 3 vezes com TBS-T e incubados com o anticorpo anti- $\alpha$ AI-1 produzido em coelho (diluído 1:750 em TBS contendo 1% de BSA e 0.005% de Tween-20) durante 4h a 37°C. As lavagens foram repetidas como descrito acima e incubou-se com o anticorpo secundário: anti-IgG produzido em coelho e conjugado a Fosfatase Alcalina (Sigma cta. N. 3687) (diluído 1:5000 em TBS) durante 2h a 37°C. Seguiram novamente as lavagens, como descrito acima, e adicionou-se 100  $\mu$ L de solução reveladora (1 mg/mL pNPP – p- nitrofenil fosfato) dissolvido em solução 1M dietanolamina contendo 0.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, pH 9.8). Após incubação no escuro durante 45 min, a absorbancia foi medida em 405 nm. Baseado na curva padrão obtida por ELISA, utilizando diferentes concentrações da proteína  $\alpha$ -AI-1, observou-se que concentração dos

inibidores análogos daqueles presentes em feijão comum variou de 0.01 a 0.03% em relação a proteína total (Figura 10).

Para determinar a atividade das novas moléculas expressadas em plantas foram realizados ensaios de atividade inibitória de alfa-amilase, *in vitro*, aplicando do método utilizando DNS (Ácido Dinitrosalicílico) descrito por Bernfeld, 1955 (Bernfeld, P. In Methods Enzymology 1:149–158, 1955). Os extratos protéicos vegetais foram obtidos como descrito acima. Foi utilizado 100 µg de extrato total (quantificado pelo método de Bradford) na presença da enzima alfa-amilase de bicudo do algodoeiro, diluída em tampão (0.15M ácido succínico, 0.02 M CaCl<sub>2</sub> e 0.06M NaCl, pH 4.5) totalizando o volume final de 50 µL. A quantidade de enzima utilizada foi a necessária para degradar 30 µg de maltose, definida como uma unidade de atividade amilásica (UA) que corresponde ao aumento de 0.1 na OD<sub>550nm</sub>. Primeiramente, a incubação da enzima com o extrato proteico foi realizada a 37°C durante 20 min. Adicionou-se 50 µL de amido de batata 1% dissolvido no tampão de atividade da enzima (descrito acima) e incubou por 30 min a 37°C. Em seguida, foram adicionados 100 µL de solução de DNS e a reação incubada a 100°C por 5 min. Após a adição de 1 mL de água a leitura da absorbância foi determinada utilizando leitora de placa (BioRad ) no comprimento de onda de 550 nm. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados obtidos para os controles utilizando extratos de plantas não transformada ou ausência de proteínas foram considerados para eliminar o efeito da amilase endógena na reação de inibição. O nível de atividade inibitória contra α-amilase do bicudo do algodoeiro observados para as proteínas análogas variou de 36 a 75% (Figura 11), de acordo com a concentração de proteína presente (determinada nos ensaios de ELISA) que variou de 3.9 a 11.7 nM (Figura 10). Os inibidores isolados de feijão: αAI-1 e αAI-2 não mostram atividade contra alfa-amilase de *A. grandis* (Figura 11)

**Exemplo 4** – Determinação da estrutura terciária *in silico* do complexo contendo os análogos dos inibidores de α-amilase: αAIC3 e αAIA11 ativo contra alfa-amilase de *A. grandis*.

As estruturas terciárias da alfa-amilase de *A. grandis* e dos análogo  $\alpha$ AI foram preditas *in silico*, sendo modeladas pela homologia molecular utilizando como molde a estrutura de cristal do complexo contendo o inibidor  $\alpha$ AI-1 e alfa-amilase de *Tenebrio molitor* (1viw.pdb –Protein Database código) Nahoum,V.; Farisei, F.; Le-Berre-A., V.; Egloff, M.P.; Rouge, P.; Poerio, E.; Payan, F.; A Plant-seed inhibitor of two classes of alpha-amylases: x-ray analysis of *Tenebrio molitor* larvae alpha-amylase in complex with the bean *Phaseolus vulgaris* inhibitor. *Acta Crystallography*, 55-360, 1999.) depositada no Banco de Dados de estrutura de Proteínas (PDB). O alinhamento de sequências múltiplas contendo as sequencias das estruturas moldes e das moléculas para modelar foi submetido para o programa Modeller Version 9.7 (Sali A, Blundell TL: Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *Journal Molecular Biology*, 234:779-815.1993. Os modelos obtidos pelo programa Modeller foram visualizados pelo programa PyMOL (Delano, W. L. The PyMOL Molecular Graphics System (2002) on World Wide Web <http://www.pymol.org>) e analisados quanto suas propriedades estereoquímicas pelo programa PROCHECK (Laskowski RA, Macarthur MW, Moss DS, Thornton JM: Procheck - a Program to Check the Stereochemical Quality of Protein Structures. *Journal of Applied Crystallography* 1993, 26:283-291).

Os inibidores  $\alpha$ AI possuem duas alças (n-terminal e c-terminal) (Figuras 6, 7 e 12) principais envolvidas com diferenças de especificidade de interação. Uma mudança conformacional destas duas alças poderia mudar significativamente a capacidade de interagir com uma certa enzima, já que contribuem a maior parte do interface com enzima. A representação estrutural do modelo de alfa-amilase de *A. grandis* e dos análogos  $\alpha$ AIC3 e  $\alpha$ AIA11, sobrepostas e, em complexo, indicam que o esqueleto estrutural, das duas moléculas foi conservado, sendo diferenças observadas apenas nas cadeias laterais dos aminoácidos substituídos no análogo (Figura12). Uma análise visual da estrutura modelada confirma que todos os resíduos que participam dessas alças principais de interação estão presente nos análogos  $\alpha$ AI. A identificação dos resíduos envolvidos na interface de interação do modelo foi obtida no servidor Interação Proteína-Proteína (<http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/PP/server/>). O resultado formatado na Tabela 1

corresponde as mutações encontradas no inibidor de alfa-amilase análogo em comparação com os inibidores originais  $\alpha$ AI-1 e  $\alpha$ AI-2, utilizando o algoritmo disponível em <http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/PP/server/>. Os resíduos em sombreado indicam aminoácidos idênticos a sequência primária do  $\alpha$ AI-1, enquanto que os resíduos não sombreados indicam aminoácidos da sequência de  $\alpha$ AI-2. Além disso, a Tabela contém o número de pontes de hidrogênio (Ptes H) formado com cada um dos resíduos, estimativas de contribuição da área que cada resíduo ocupa na superfície da molécula, assim como a porcentagem que esta área representa no complexo (enzima-inibidor) total.

10 **Tabela 1. Resíduos envolvidos na interface de interação das estruturas modeladas dos complexos enzima-inibidores (parental e análogos mutantes) –**

Resíduo	Seq. AI-1	Seq. AI-2	Seq. AI-1	Seq. AI-2	% AI-1	% AI-2	Ptes H	Área de superfície	% área de interface	N. resíduo $\alpha$ AI-A11	Nom e resíduo $\alpha$ AI-A11	Área de superfície	Pontes H	% área de interface	Nom e Resíduo $\alpha$ AI-2
524	HIS	33	0	2						524	HIS	33	0	2	
525	THR	18	0	1						525	THR	18	0	1	
526	VAL	48	0	4						526	VAL	48	0	4	
531	SER	3	1	0						531	SER	3	1	0	
															GLN
															VAL
										592	ARG	43	0	3	
										670	ILE	29	0	2	
										668	THR	19	0	1	ILE
										673	VAL	43	0	3	VAL
										674	HIS	133	0	10	HIS
										675	GLU	63	0	5	GLU
										676	TYR	20	0	1	TYR
										678	PHE	87	0	6	PHE
<b>Total</b>		847	12	61			797	1	56			596	6	43	
<b>Resíduos AI-1</b>					AIC 309					AI A11 08					
<b>Resíduos AI-2</b>					AIC 306					AI A11 05					

Observa-se que em relação as duas alças principais de interação (Figura 6 e figura 7), que o mutante análogo  $\alpha$ AIC3 possui sequencia da alça n-terminal idêntica a do inibidor  $\alpha$ AI-1. Em relação a alça c-terminal, o análogo  $\alpha$ AIC3 apresenta sequencia idêntica a do  $\alpha$ AI-2. Na Figura 12 contendo a representação esquemática da estrutura do complexo modelado é possível visualizar a posição dos resíduos mencionados na Tabela 1.

Contudo, como modelagem por homologia, possui limitações em relação a flexibilidade da estrutura a ser modelada sobre um molde, a estrutura modelada acaba se diferenciando pouco do seu molde. A elucidação de diferenças de estruturas envolvidas na criação de inibição no análogo mutante, por enzima não inibida pelos inibidores originais depende de estudos em nível mais profundo envolvendo dinâmica molecular. Nesse caso, se cria condições em que as estruturas possam se movimentar livremente e assumir inúmeras conformações até que encontre o mínimo local de energia livre, indicando uma conformação mais apropriada para o modelo. No entanto, este tipo de estudo envolve enorme tempo computacional e capacitação de programação utilizando energia quântica.

**REIVINDICAÇÕES**

1. Moléculas isoladas de ácido nucléico caracterizadas por compreender:
  - a) seqüências substancialmente similares a qualquer uma das seqüências selecionadas do grupo identificado como SEQ ID NO 1-2;
  - 5 b) complementos das seqüências descritas em SEQ ID NO1-2;
  - c) complementos reversos das seqüências descritas em SEQ ID NO1-2;
  - d) seqüências reversas das seqüências descritas em SEQ ID NO1-2.
2. Construção gênica caracterizada por compreender a molécula isolada da reivindicação 1.
- 10 3. Construção gênica caracterizada por compreender:
  - a) um promotor opcionalmente ligado a uma seqüência líder e operacionalmente ligado a;
  - b) uma seqüência codificadora substancialmente similar à qualquer uma das seqüências identificadas como SEQ ID NO1-2.
- 15 4. Construção gênica de acordo com a reivindicação 3 caracterizada pelo fato do promotor ser selecionado do grupo consistindo de constitutivos, induzíveis e tecido-específicos.
5. Construção gênica de acordo com a reivindicação 4 caracterizada pelo fato do promotor tecido-específico ser selecionado entre promotores de genes de fibra de algodão.
- 20 6. Construção gênica de acordo com a reivindicação 5 caracterizada pelo fato dos promotores de genes de fibra de algodão serem selecionados do grupo consistindo de E6, H6S, Rac13, LTP, ACP, Expansina, CAP, Anexina, FbL2A e actina 2.
- 25 7. Construção gênica de acordo com a reivindicação 3 caracterizada pelo fato do promotor conter elementos enhancers.

8. Construção gênica de acordo com a reivindicação 3 caracterizada pelo fato do promotor poder ser expresso em plantas, animais, bactérias, fungos ou insetos.
9. Construção gênica de acordo com a reivindicação 3 caracterizada pelo fato da seqüência líder ser obtida do mesmo gene que o promotor utilizado para dirigir a transcrição da molécula isolada de ácido nucleico.
- 5 10. Vetor binário caracterizado por conter uma construção gênica de acordo com qualquer uma das reivindicações 2-9.
11. Vetor binário caracterizado por compreender:
  - 10 a. um promotor opcionalmente ligado a uma seqüência líder e operacionalmente ligado a
  - b. uma seqüência codificadora substancialmente similar à qualquer uma das seqüências identificadas como SEQ ID NO1-2 operacionalmente ligada a;
  - c. um sinal de terminação;
  - 15 d. uma origem de replicação;
  - e. um marcador seletivo; e
  - f. um sítio de clonagem
12. Vetor binário de acordo com a reivindicação 11 caracterizado pelo fato do promotor ser selecionado do grupo consistindo de constitutivos, induzíveis e tecido-específicos.
- 20 13. Vetor binário de acordo com a reivindicação 12 caracterizado pelo fato do promotor tecido-específico ser selecionado entre promotores de genes de fibra de algodão.
14. Vetor binário de acordo com a reivindicação 13 caracterizado pelo fato dos promotores de genes de fibra de algodão serem selecionados do grupo consistindo de E6, H6S, Rac13, LTP, ACP, Expansina, CAP, Anexina, FbL2A e actina 2.
- 25 15. Vetor binário de acordo com a reivindicação 11 caracterizado pelo fato do promotor conter elementos enhancers.
- 30 16. Vetor binário de acordo com a reivindicação 11 caracterizado pelo fato da seqüência líder ser obtida do mesmo gene que o promotor utilizado para dirigir a transcrição da molécula isolada de ácido nucleico.

17. Vetor binário de acordo com a reivindicação 11 caracterizado pelo fato do promotor poder ser expresso em plantas, animais, bactérias, fungos ou insetos.
18. Vetor binário de acordo com a reivindicação 11 caracterizado pelo fato do sinal de terminação ser selecionado do grupo sinal de terminação de SV40, sinal de adenilação de HSV TK, sinal de terminação do gene da nopalina sintetase de *Agrobacterium tumefaciens* (NOS), sinal de terminação do gene da octopina sintetase, sinal de terminação do gene 19S e 35S do CaMV, sinal de terminação do gene da álcool desidrogenase de milho, sinal de terminação do gene da manopina sintetase, sinal de terminação do gene da beta-faseolina, sinal de terminação do gene da ssRUBISCO, sinal de terminação do gene da sucrose sintetase, sinal de terminação do vírus que ataca o *Trifolium subterranean* (SCSV), sinal de terminação do gene trpC de *Aspergillus nidulans* e outros semelhantes.
19. Vetor binário de acordo com a reivindicação 11 caracterizado pelo fato do marcador seletivo ser selecionado entre seqüências que conferem resistência a antibióticos ou marcadores visuais.
20. Vetor binário de acordo com a reivindicação 19 caracterizado pelo fato marcador seletivo ser selecionado entre as seqüências codificadoras dos genes canamicina, neomicina, ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, higromicina, geneticina, fosfotricina, glifosato, glufosinato de amônio, AHAS, BAR e GUS.
21. Polipeptídeos isolados, caracterizados por compreender seqüências substancialmente similares a qualquer uma das seqüências selecionadas do grupo identificado como SEQ ID NO 3-4.
22. Polipeptídeos de acordo com a reivindicação 21, caracterizados por exibir atividade inseticida, quando administrado oralmente, a larvas de insetos susceptíveis.
23. Polipeptídeos de acordo com a reivindicação 21, caracterizados por exibir atividade inseticida, quando fornecido em uma dieta administrada oralmente a uma larva de inseto coleóptero.
24. Polipeptídeos de acordo com a reivindicação 23, caracterizados pelo fato de a larva de inseto ser uma larva de bicudo-do-algodoeiro.

25. Polipeptídeos isolados de acordo com as reivindicações 21 a 24, caracterizados por ser um inibidor de  $\alpha$ -amilase.
26. Célula transformada caracterizada pelo fato de conter uma construção gênica de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 9.
- 5 27. Célula transformada caracterizada pelo fato de conter um vetor binário de acordo com qualquer uma das reivindicações 10 a 20.
28. Célula transformada caracterizada pelo fato de conter um polipeptídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações de 21 a 25.
29. Célula transformada de acordo com as reivindicações 22-28 caracterizada pelo  
10 fato da célula ser oriunda de qualquer um dos grupos consistindo de bactérias, fungos, insetos, mamíferos e vegetais.
30. Planta, ou uma parte, ou um propágulo ou progênie da mesma caracterizada por compreender uma construção gênica de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 9.
- 15 31. Planta, ou uma parte, ou um propágulo ou progênie da mesma caracterizada por compreender um vetor binário de acordo com qualquer uma das reivindicações 10 a 20.
32. Planta, ou uma parte, ou um propágulo ou progênie da mesma caracterizada pelo  
20 fato de possuir um polipeptídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações de 21 a 25.
33. Microorganismo, ou uma parte do mesmo caracterizado por compreender uma construção gênica de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 9.
34. Microorganismo, ou uma parte do mesmo caracterizado por compreender um vetor binário de acordo com qualquer uma das reivindicações 10 a 20.
- 25 35. Microorganismo, ou uma parte do mesmo caracterizado por compreender um polipeptídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações de 21 a 25.
36. Método para produzir um organismo geneticamente modificado caracterizado pelo fato de compreender as seguintes etapas:
- 30 a. transformar uma célula, tecido, órgão ou embrião com uma construção gênica de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 9 ou um vetor binário de acordo com qualquer uma das reivindicações 10 a 20;
- b. selecionar células transformadas, calos de células, embriões ou sementes;

- c. regenerar plantas maduras, embriões maduros ou microorganismos de células transformadas, calos de células, embriões ou sementes selecionados na etapa (b);
  - d. selecionar plantas maduras, embriões maduros ou células de microorganismos da etapa (c) contendo a construção gênica ou vetor binário de acordo com qualquer uma das reivindicações de 2 a 20.
- 5
37. Método para produção de proteína recombinante caracterizado pelo fato de compreender as seguintes etapas:
- a. transformar uma célula, tecido, órgão ou embrião com um vetor binário de acordo com qualquer uma das reivindicações 10 a 20;
  - b. selecionar células transformadas, calos de células, embriões ou sementes;
  - c. regenerar plantas maduras, embriões maduros ou microorganismos de células transformadas, calos de células, embriões ou sementes selecionados na etapa (b);
  - d. selecionar plantas maduras, embriões maduros ou células de microorganismos da etapa (c) contendo vetor binário de acordo com qualquer uma das reivindicações 10 a 20;
  - e. Fazer a extração da proteína recombinante produzida nos organismos selecionados na etapa (d).
- 10
- 15
- 20
38. Proteína recombinante obtida através do método descrito na reivindicação 37.
39. Proteína recombinante de acordo com a reivindicação 38 caracterizada pelo fato da proteína ter atividade inibidora de alfa amilase.
40. Composição pesticida biodegradável caracterizada por compreender uma concentração eficaz do polipeptídeo isolado de acordo com qualquer uma das reivindicações de 21 a 25 ou análogo mutante, em um veículo carreador agronomicamente aceitável.
- 25
41. Composição pesticida biodegradável de acordo com a reivindicação 40, caracterizada pelo fato de o veículo carreador aceitável ser um microorganismo transformado.
- 30
42. Composição pesticida biodegradável de acordo com a reivindicação 41, caracterizada pelo fato de que um veículo carreador aceitável pode ser um agente superfície-ativo, um veículo carreador inerte, um preservativo, um

umectante, um estimulante de alimentação, um atrativo, um agente encapsulante, um ligante, um emulsificador, um corante, um protetor uv (ultra-violeta), um tampão, um agente de fluxo ou fertilizante, doadores de micronutriente, ou outras preparações que influenciam o crescimento da planta.

5 43. Composição pesticida biodegradável de acordo com a reivindicação 40, caracterizada pelo fato de o polipeptídeo uma das reivindicações de 21 a 25 ou análogo mutante ser usado em combinação com  $\delta$ -endotoxinas Bt ou outras proteínas inseticidas.

10 44. Método para o controle de uma praga caracterizado por compreender as seguintes etapas:

a) detectar a ocorrência da praga em um ambiente;

b) promover o contato da praga com uma proteína pesticida isolada ou com uma composição da invenção, em que a referida proteína consiste das seqüências selecionadas do grupo de seqüências de aminoácidos descritas em SEQ ID N°3-4.

15

45. Método de obtenção de linhagens transgênicas resistentes a um inseto praga, caracterizado por compreender as seguintes etapas:

a) transformar uma cultivar de interesse com uma construção gênica de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 9 ou um vetor binário de acordo com qualquer uma das reivindicações 10 a 20;

20

b) regenerar linhagens transgênicas contendo a referida construção estavelmente integrada em seus genomas;

c) selecionar as linhagens transgênicas com os maiores níveis de expressão do inibidor de alfa amilase da invenção.

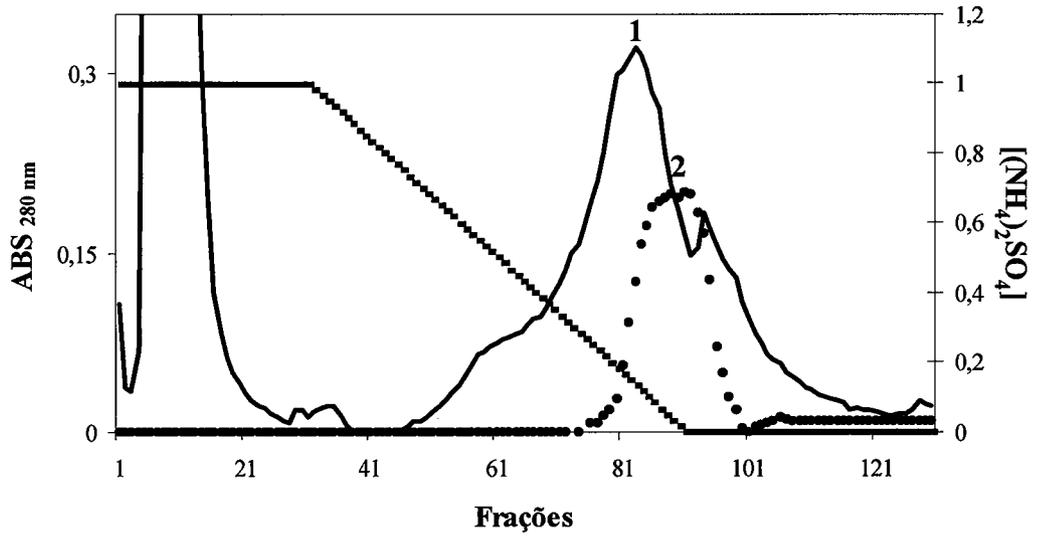


FIGURA 1

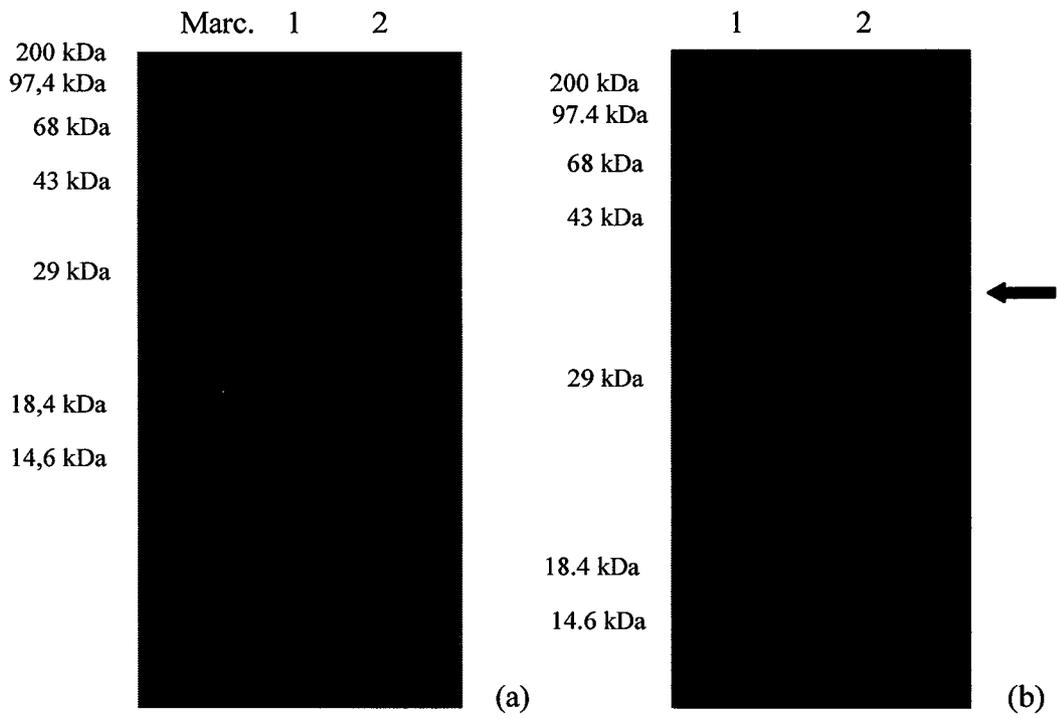


FIGURA 2

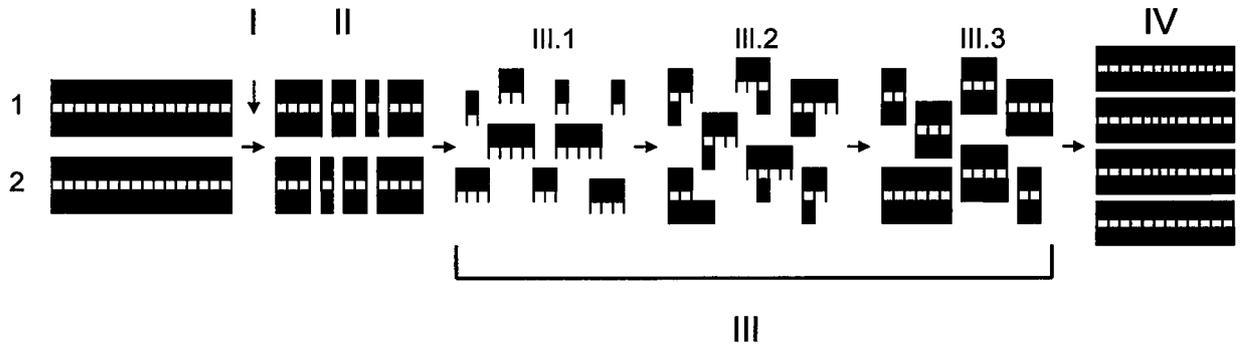


FIGURA 3 -

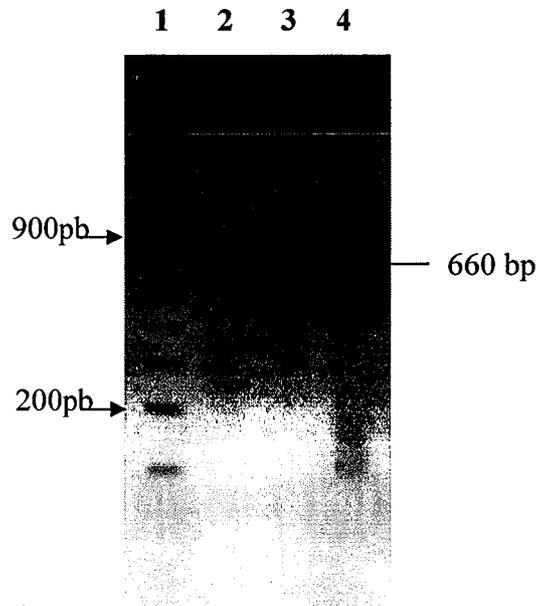


FIGURA 4

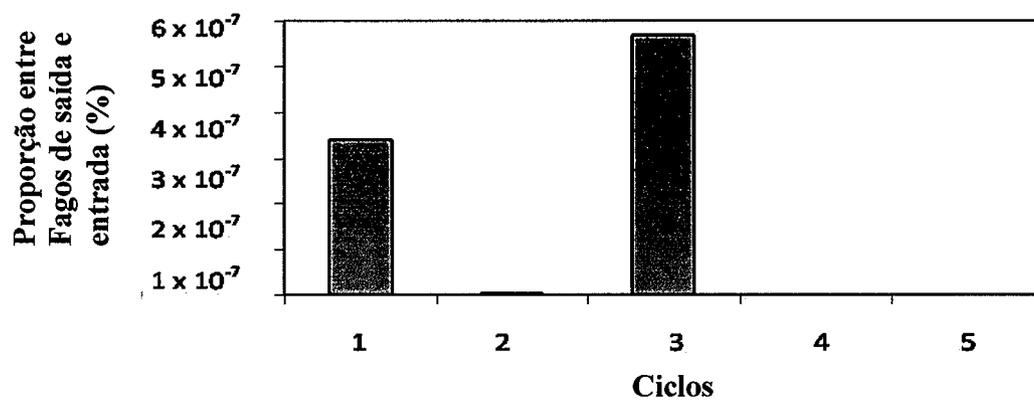


FIGURA 5

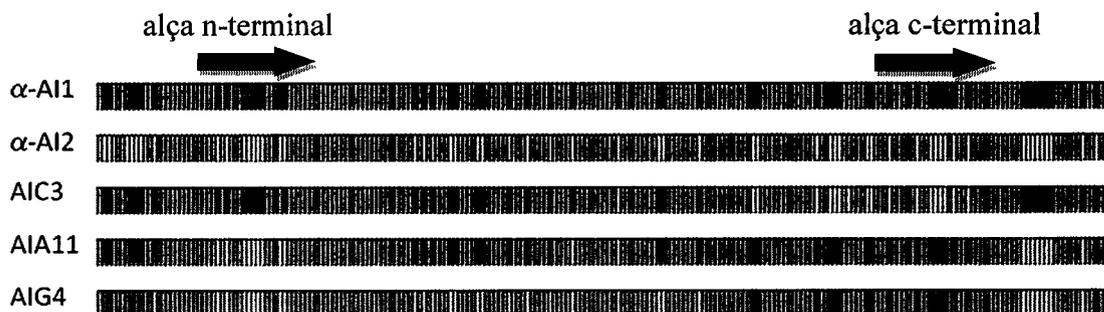


FIGURA 6

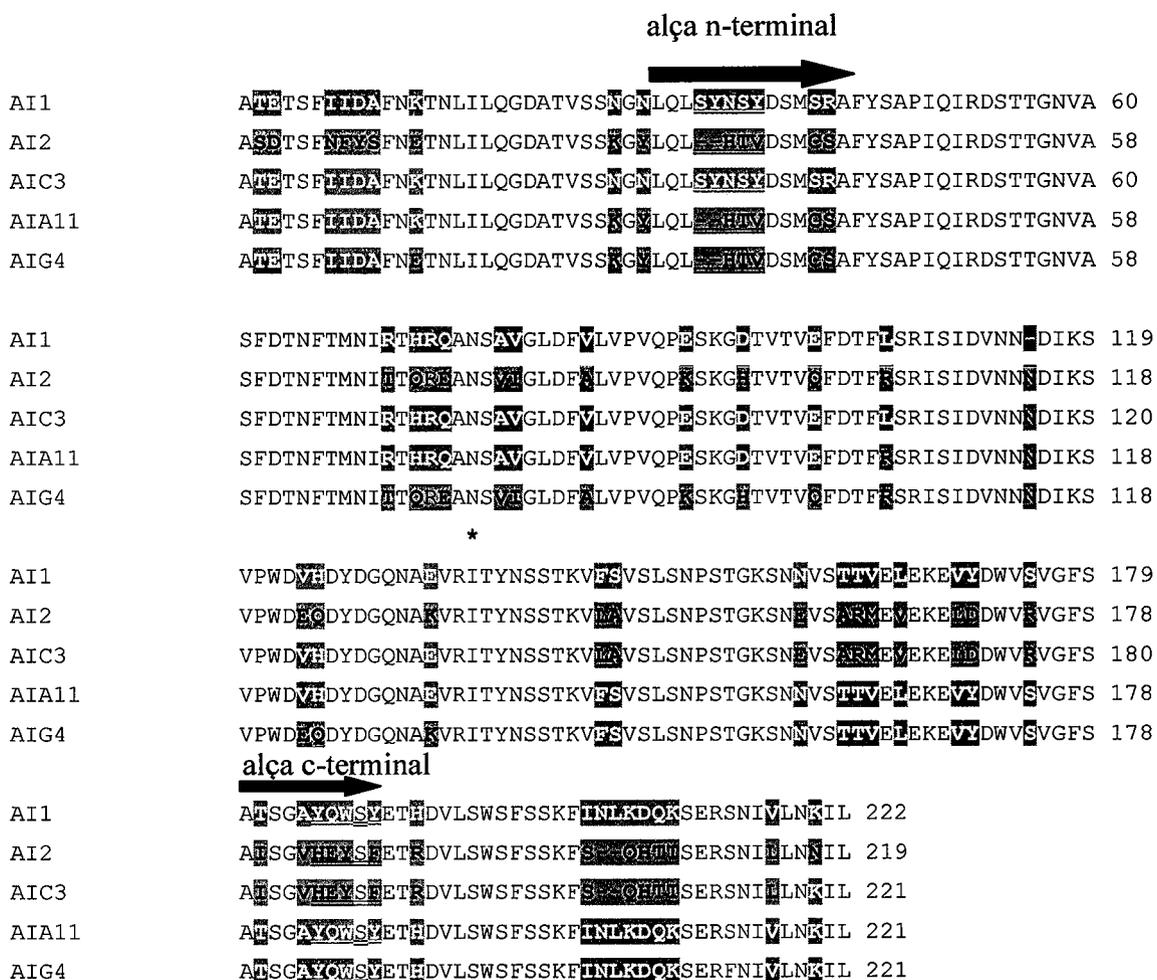


FIGURA 7

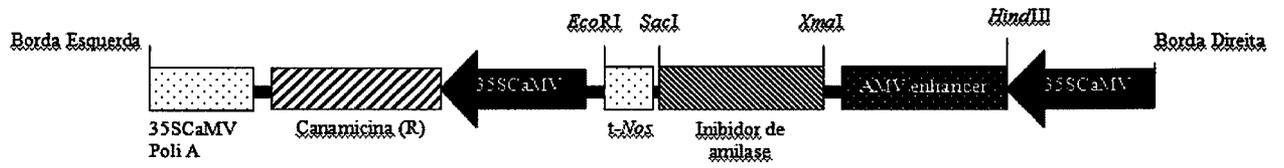


FIGURA 8

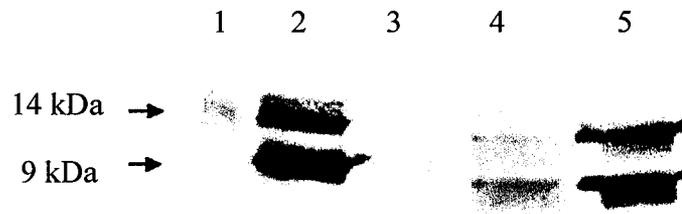


FIGURA 9

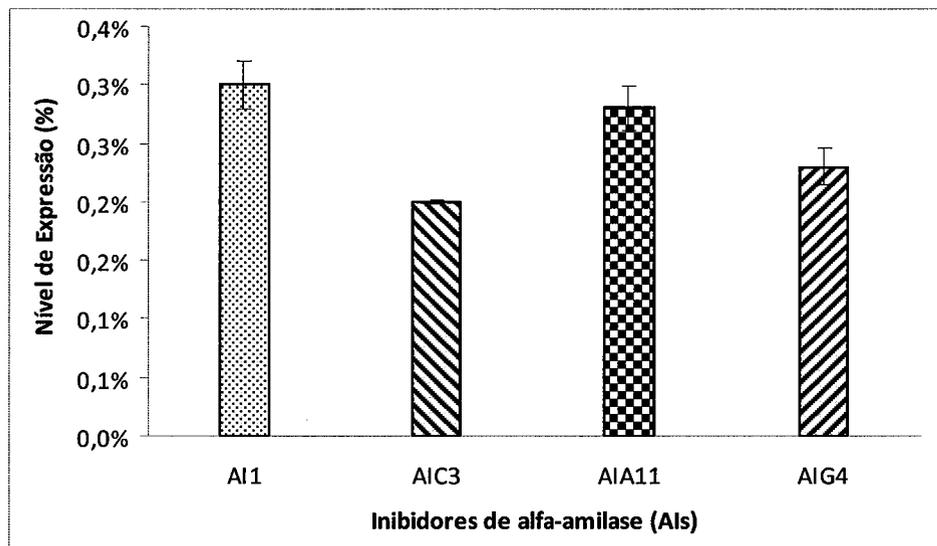


FIGURA 10

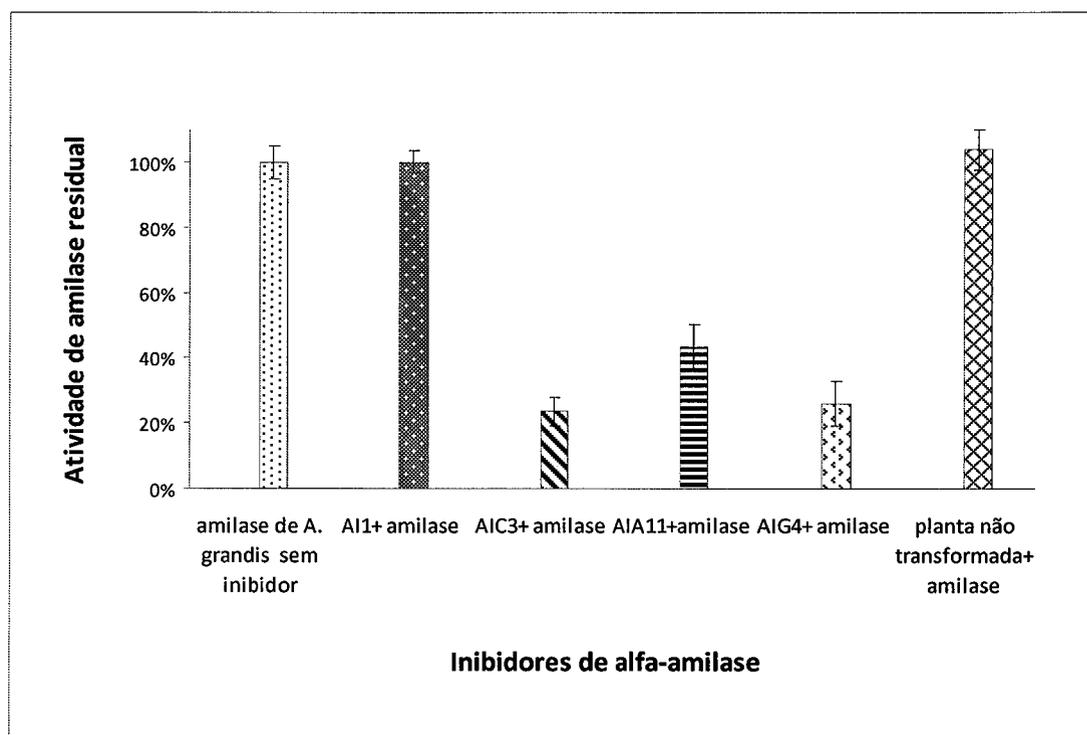


FIGURA 11



FIGURA 12

**RESUMO**

**“MUTANTES DE INIBIDORES DE ALFA AMILASES ISOLADOS DE  
Phaseolus vulgaris COM PROPRIEDADES DE CONTROLAR INSETOS-  
PRAGA, COMPOSIÇÕES CONTENDO TAIS MUTANTES E MÉTODO DE  
5 UTILIZAÇÃO DOS MESMOS”**

A presente invenção refere-se ao campo de controle de insetos-praga, utilizando métodos e composições que compreendem análogos mutantes de inibidores de alfa-amilases ( $\alpha$ AIIs). Mais especificamente a invenção fornece novas moléculas análogas de mutantes dos  $\alpha$ AIIs para o controle de insetos-praga, particularmente o bicudo-do-  
10 algodoeiro (*Anthonomus grandis*), apresentando redução parcial ou total da atividade amilolítica de enzimas digestivas presentes no lúmen intestinal do inseto. São também aspectos da invenção, construções gênicas contendo as moléculas de ácido nucleico, codificantes para os inibidores de alfa-amilases, métodos para a expressão heteróloga das novas moléculas na forma ativa, bem como o uso das mesmas no controle de  
15 insetos-praga. A invenção também fornece genes análogos sintéticos, os quais são otimizados para transformação e expressão dos mesmos em plantas.