

RAQUEL OLIVEIRA MOREIRA

**SINERGISMO ENTRE AS PROTEÍNAS BACTERIANAS INSETICIDAS
TXP40, XnGROEL, Vip3Aa20, Cry9Aa1 e Chi PARA O CONTROLE DE
*Helicoverpa armigera***

Relatório de Pós-doutorado realizado na
Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias, Departamento de Biologia,
Jaboticabal.

Supervisor: Profa. Dra. Janete
Apparecida Desidério

Estágio de Pós-Doutorado na modalidade PD-III (sem financiamento)

Jaboticabal

2024

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA FACULDADE
DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL
Departamento de Biologia

RELATÓRIO CIENTÍFICO FINAL

**SINERGISMO ENTRE AS PROTEÍNAS BACTERIANAS INSETICIDAS TXP40, XnGROEL,
Vip3Aa20, Cry9Aa1 e Chi PARA O CONTROLE DE
*Helicoverpa armigera***

Estágio de Pós-Doutorado na modalidade PD-III (sem financiamento)

Pós-doutoranda: Dra. Raquel Oliveira Moreira

Supervisor: Profa Dra. Janete Aparecida Desidério

Instituição Sede: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

DMP ID: <https://doi.org/10.48321/D1T65C>

Relatório Científico Final apresentado à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal referente às atividades desenvolvidas no período de 04/10/2023 a 04/10/2024

Jaboticabal - SP
Novembro de 2024

Sumário

RELATÓRIO CIENTÍFICO FINAL: RESUMO	3
PARTE I - PROJETO DE PESQUISA: SINERGISMO ENTRE AS PROTEÍNAS INSETICIDAS TXP40, XnGROEL, Vip3Aa20, Cry9Aa1 e Chi PARA O MANEJO DE <i>Helicoverpa armigera</i> .	4
1. Introdução	4
2. Material e Métodos	6
3. Resultados	8
4. Conclusão	12
5. Financiamento	13
6. Nota Justificativa	13
Referências	13
PARTE 2 - ATIVIDADES ACADÊMICAS, CIENTÍFICAS E TÉCNICAS	16
1. Artigos em fase de revisão por pares	16
2. Artigos publicados	16
3. Trabalhos de Conclusão de Curso de Graduação	16
4. Participação em feiras e trabalhos de extensão	16
5. Atividades técnicas e assessoria	17

RELATÓRIO CIENTÍFICO FINAL: RESUMO

Este relatório apresenta um panorama abrangente dos experimentos conduzidos durante o período de pós-doutoramento em que a pesquisadora esteve envolvida. A primeira parte descreve os resultados das atividades científicas relacionadas ao projeto desenvolvido, enquanto a segunda parte aborda as atividades acadêmicas, científicas e técnicas realizadas pela pós-doutoranda nesse período. O projeto científico teve como objetivo avaliar a interação entre as proteínas Vip3Aa20 e Cry9Aa1 de *Bacillus thuringiensis*, a proteína Txp40 de *Photorhabdus akhurstii* e XnGroEL de *Xenorhabdus nematophila* em *Helicoverpa armigera*. Durante o período, a pesquisadora dedicou-se à clonagem do gene *cry9* e à expressão de proteínas heterólogas para os estudos de interação. Os experimentos foram realizados com rigor, para o avanço do conhecimento sobre as interações moleculares entre essas proteínas e seus possíveis impactos no controle de pragas agrícolas. Na segunda parte do relatório, destacam-se as contribuições da pós-doutoranda em eventos de extensão, elaboração de artigos científicos e participação em bancas examinadoras de trabalhos de conclusão de curso. Além disso, a pesquisadora atuou como integrante da Incubadora de Empresas de Base Tecnológica da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária (FCAV), no campus da UNESP em Jaboticabal, representando a incubadora em organizações de palestras, eventos de networking e reuniões destinadas à promoção do ecossistema de inovação e empreendedorismo de Jaboticabal e região. A pesquisadora colaborou na formalização da Inova.Jab como Ambiente de Inovação, junto à Agência UNESP de Inovação (AUIN) e à Secretaria de Ciência, Tecnologia e Inovação do Estado de São Paulo. Ademais, a pós-doutoranda também prestou suporte à FUNEP – Fundação de Apoio à Pesquisa, Ensino e Extensão, na elaboração da proposta técnica e no pleiteamento do Chamamento Público Nº 03/2023 (versão de 28/11/2023) publicado pela Prefeitura Municipal de Jaboticabal. Essa iniciativa visou a implementação de ações de governança e gestão de projetos do Arranjo Produtivo Local (APL) do agronegócio, com foco em ações destinadas à população da região e aos agentes ativos da cadeia produtiva do amendoim (empreendedores, associações, instituições de ensino e grupos de pesquisa), promovendo a consolidação e o crescimento do ecossistema inovador e do empreendedorismo de alto impacto em Jaboticabal-SP.

PARTE I - PROJETO DE PESQUISA: SINERGISMO ENTRE AS PROTEÍNAS INSETICIDAS TXP40, XnGROEL, Vip3Aa20, Cry9Aa1 e Chi PARA O MANEJO DE *Helicoverpa armigera*

1. Introdução

A lagarta *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Heliethinae: Noctuidae) é uma importante praga polífaga agrícola. Desde a sua primeira identificação no território brasileiro (Czepak et al., 2013), é causadora de prejuízos anuais de milhões em consequência dos seus ataques (Pomari-Fernandes et al., 2015; Haile et al., 2021).

Dentre as tecnologias para seu controle destacam-se os inseticidas químicos, biológicos e a utilização de plantas transgênicas que expressam proteínas inseticidas de *Bacillus thuringiensis* (Bt) (Haile et al., 2021). No entanto, um aumento significativo na sobrevivência das populações de *H. armigera* no decorrer das safras foi identificado mediante os principais inseticidas recomendados para o controle desta praga (IRAC, 2023).

Em relação às plantas transgênicas resistentes a insetos, a proteína Vip3Aa20 está presente em eventos de milho, enquanto a proteína Vip3Aa19 é expressa em algodão (CTNBIO, 2023). Essas proteínas exercem alta toxicidade a lepidópteros-praga e são importantes estratégias para retardar a resistência cruzada (Quan e Wu, 2023).

Entretanto, a combinação entre a ecologia da *helicoverpa* e as complexas interações entre os genes piramidados nas construções dos cultivares aumentará a frequência de alelos de resistência ao longo do tempo. Esses fatores favorecem o desenvolvimento de populações resistentes às proteínas Vip3, exigindo-se novas estratégias de manejo (Quan e Wu, 2023). Nesse sentido, estudos envolvendo a *helicoverpa*, proteínas Vip3A e outras moléculas inseticidas são importantes para ampliar o conhecimento a respeito dos mecanismos de interação entre a proteína e o inseto, colaborar na elucidação do modo de ação da Vip3 e contribuir para o desenvolvimento de piramidações gênicas eficientes e sustentáveis

Dentre moléculas alternativas à Vip3A, a proteína Cry9 de Bt é dita lepidoptera específica e, apesar de não existir nenhum evento comercial utilizando tal proteína, estudos revelam que essa família de proteína potencializa o efeito citotóxico em sinergia com Vip3Aa (Wang et al., 2018). Quitinases de Bt também são potenciais candidatas para entomopatogenicidade em *H. armigera*. As quitinases de Bt podem potencializar o efeito das proteínas Cry ou Vip3 através da danificação ou degradação da membrana peritrófica intestinal da praga, estrutura composta em maioria por

proteínas e fibras de quitina (Barboza-Corona, 2003; Dhole et al., 2021). Um gene de quitinase (gene *Chi*) foi clonado para a expressão heteróloga e sua atividade bioquímica foi caracterizada por um grupo de pesquisa parceiro (Augusto, 2014). Observa-se a viabilidade, portanto, em explorar essa quitinase combinada com outras proteínas inseticidas.

Alternativamente às proteínas Cry9 e Chi de Bt, podemos apontar algumas espécies de bactérias como potencial fonte de genes para obtenção de eventos transgênicos, produção heteróloga para bioinseticidas ou para aprofundamento em estudos de sinergismo. As bactérias gram-negativas *Xenorhabdus nematophila* e *Photorhabdus akhurstii*, pertencentes à família Enterobacteriaceae, também são organismos eficientes na secreção de proteínas inseticidas (Ffrench-Constant et al., 2007).

A proteína homóloga XnGroel, isolada de *X. nematophila*, possui toxicidade para a lagarta *H. armigera* tanto em dieta artificial (Joshi et al., 2008), quanto em tabaco transgênico expressando altas doses da proteína testado na mesma praga (Kumari et al., 2014). Diferentemente de outras proteínas inseticidas que causam toxicidade por ação enzimática ou por citólise, em *H. armigera*, o modelo de ligação proposto se refere à junção da proteína XnGroel na quitina da membrana peritrófica, inibindo o metabolismo da quitina e consequentemente o desenvolvimento da praga (Joshi, 2008).

No mesmo sentido, a espécie *P. akhurstii* é fonte doadora do gene *txp40*, responsável por uma proteína que também apresenta atividade entomopatogênica em pragas da ordem Lepidoptera (Brown et al., 2006; Mathur et al., 2018; Shankhu et al., 2019). Sugere-se que Txp40 interage com os receptores caderina, ABCC2, APN1 e ALP por ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas e hidrofóbicas no intestino de *H. armigera*, mesmos receptores envolvidos no modo de ação de proteínas Cry de Bt (Shankhu et al., 2019). Porém nada foi comprovado e estudos de ligação se tornam interessantes para confirmar se Txp40 compete pelos mesmos sítios de ligação em relação às proteínas Cry.

De maneira geral, estudos através de ensaios de toxicidade e de interações moleculares são indispensáveis para ampliar o espectro de ação dos produtos oriundos dos gêneros Bt, *X. nematophila* e *P. akhurstii* a diferentes espécies de pragas. Em especial, cita-se aquelas pragas onde não há uma estratégia de manejo sustentável e economicamente viável ou que estão expostas à recorrente pressão de seleção de transgênicos de Bt, onde Vip3Aa é a proteína que ainda garante o sucesso desses eventos comerciais. Este projeto teve como objetivo avaliar a interação entre

as proteínas Cry9Aa1 e Vip3Aa20 de *Bacillus thuringiensis*, proteína Txp40 de *Photorhabdus akhurstii* e XnGroel de *Xenorhabdus nematophila* em *Helicoverpa armigera*, para avançar no conhecimento sobre as interações moleculares entre essas proteínas e seus possíveis impactos no controle de pragas agrícolas

2. Material e Métodos

2.1 Caracterização do experimento

O projeto foi supervisionado pela Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério e executado no Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA), do Departamento de Biologia, localizado na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV-UNESP, Câmpus de Jaboticabal – SP.

2.2 Clonagem do gene *cry9Aa1* de *Bacillus thuringiensis*

O gene *cry9Aa1* (GenBank: X58120.1) foi originalmente isolado do DNA plasmidial da cepa recombinante de *E. coli* denominada ECE130, cedida pelo Bacillus Genetic Stock Centre. A extração do plasmídeo do clone *E. coli* ECE130 foi feita após a obtenção de colônias isoladas da cepa em meio sólido Luria-Bertani (LB), suplementado com 100 µg/ml de ampicilina, e cultivadas a 37°C por 12h. Posteriormente a minipreparação de DNA plasmidial foi conduzida conforme Green e Sambrook (2012). O DNA foi quantificado no espectrofotômetro NanoDrop® 2000 e visualizado e analisado por eletroforese em gel de agarose 1%, conforme Augusto (2014).

O isolamento do gene *cry9Aa1* (3471 pares de base) foi realizado por reação em cadeia de polimerase (PCR) utilizando os primers específicos (primer forward – ATGAATCAAATAAACACGGAA; primer reverse – TTACTTTTCTGTTTCAACGAATT). As concentrações de reagentes e temperatura de anelamento dos primers serão testadas até encontrar a que melhor amplifique o material. Inicialmente, a mix foi composta por 3 µl de DNA plasmidial obtido do clone *E. coli* ECE130 (100 ng/µl), 1,0 µl de primer reverse (10 pmol), 1,0 µl de primer forward (10 pmol), 12,5 µl de Master Mix 2x High Fidelity (Cellco) e 7,5 µl de água deionizada estéril. As condições de amplificação foram de desnaturação inicial a 94°C por 2 min, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 55°C por 1 min, extensão a 72°C por 1 min e ao final dos ciclos, extensão final a 72°C por 10 min. A visualização e análise da PCR foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1%.

O produto de PCR foi purificado usando o QIAquick PCR Purification Kits (QIAGEN) de acordo com as instruções do fabricante. O DNA obtido foi quantificado por espectrofotometria pelo aparelho Nanodrop (Thermo Scientific®) e a integridade foi

analisada em gel de agarose a 1%. O *amplicon* foi clonado utilizando o vetor de expressão pET-SUMO (Invitrogen®). Para clonar o produto de PCR com extremidades 3'A que não são geradas pela de Master Mix 2x HF (Cellco), 1U de Taq DNA Polymerase recombinant) (Thermo Scientific) foi adicionada ao produto de PCR e submetido a 72°C por 8 min para adicionar adenina nas extremidades do inserto, aumentando a eficiência de ligação do fragmento ao vetor, o qual possui extremidades de timina.

A clonagem do gene *cry9Aa1* no vetor de expressão pET-SUMO foi realizada de acordo com as recomendações expressas pelo fabricante. A construção gênica Cry9Aa1::pET-SUMO foi introduzida em células competentes de *E. coli* BL21(DE3), através do método de transformação por choque térmico (Hanahan, 1983) e sob pressão de seleção do antibiótico canamicina (50 µg/mL). As colônias obtidas foram inoculadas em meio LB líquido suplementado com o mesmo antibiótico, para retirada de alíquotas para armazenamento e obtenção do DNA plasmidial. A extração do DNA plasmidial dos clones foi realizada (Green e Sambrook, 2012) e a confirmação do inserto inserido foi realizada por PCR com primers específicos. Para verificação se o gene *cry9Aa1* clonado em vetor de expressão pET-SUMO® está na orientação de leitura correta em relação ao promotor do vetor, a amplificação desses genes foi realizada por PCR com o primer SUMO F (5'-AGATTCTTGTACGACGGTATTAG-3'), cuja sequência está presente no vetor pET-SUMO, juntamente com o primer anti-senso específico do gene.

2.3 Obtenção da proteína Chi de *Bacillus thuringiensis*

O gene *chi* (GenBank: KJ676691.1), clonado no plasmídeo pET-SUMO será induzido e a proteína extraída a partir de clones recombinantes de *E. coli* BL21 (DE3) One Shot, conforme realizado por Augusto (2014). As etapas de análise por SDS-PAGE, purificação em coluna de histidina, diálise, liofilização e quantificação serão realizadas conforme descrito na obtenção da proteína Cry9Aa1 (item 3.2).

2.4 Obtenção da proteína Vip3Aa20 de *Bacillus thuringiensis*

A proteína comercial Vip3Aa20 (GenBank: DQ539888), clonada em *E. coli* XL1-Blue, plasmídeo pBD150, foi produzida, purificada e disponibilizada pela Syngenta (Holambra, Brasil). O produto protéico foi cedido liofilizado, sendo necessário apenas a ressuspensão (1 mg/ml) e análise em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12% de acordo com Laemmli (1970). A eletroforese foi feita utilizando o sistema de corrida Mini Protean (Bio-Rad).

2.5 Obtenção da proteína Chi de *Bacillus thuringiensis*

O gene *chi* (GenBank: KJ676691.1), clonado no plasmídeo pET-SUMO foi induzido e a proteína extraída a partir de clones recombinantes de *E. coli* BL21 (DE3) One Shot, conforme realizado por Augusto (2014). A análise em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12% de acordo com Laemmli (1970). A eletroforese foi feita utilizando o sistema de corrida Mini Protean (Bio-Rad).

2.6 Obtenção das proteínas Txp40 de *P. akhurstii* e XnGroel de *X. Nematophila*

Os clones contendo os genes Txp40 (GenBank: MH052595) e XnGroel (GenBank: AY184491.2), unidos em vetor pET-28a (+) e inseridos em *E. coli* BL21 (DE3) One Shot foram induzidos e as proteínas foram extraídas conforme descrito por Marucci et al. (2015), com alteração da temperatura de indução a 37 °C e concentração final de 1 mM de isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG). A análise em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12% de acordo com Laemmli (1970). A eletroforese foi feita utilizando o sistema de corrida Mini Protean (Bio-Rad).

3. Resultados

3.1 Clonagem do gene *cry9Aa1* de *Bacillus thuringiensis*

Por meio da amplificação do DNA plasmidial extraído de clones de *E. coli* designados como ECE 130 (1 e 2), foi possível identificar uma banda única correspondente ao tamanho esperado de 3471 pb, confirmando o isolamento do gene *cry9Aa1* (Figura 1).

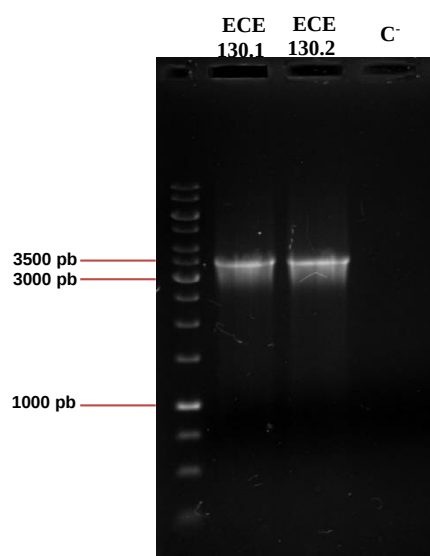


Figura 1. Análise do produto de PCR do gene *cry9Aa1*. Amplificação realizada a partir do DNA plasmidial de clones de *E. coli* denominados como ECE 130. Obtenção de banda única de tamanho esperado de 3471 pb para *cry9Aa1*. PM refere-se ao Padrão Molecular kb DNA Ladder (GeneRuler™) e C– ao controle negativo da reação. Aplicação em gel de agarose,

concentração 0,8% a 90V por ~1h30min.

A purificação do produto de PCR do gene *cry9Aa1* foi realizada utilizando o QIAquick PCR Purification Kit, com o objetivo de eliminar contaminantes como primers remanescentes, nucleotídeos livres e outros resíduos do processo de amplificação. A quantificação do DNA purificado foi realizada por espectrofotometria, indicando uma concentração final de 64,8 ng/ μ L e uma razão A260/A280 de 1,98, confirmando uma alta pureza, ideal para análises subsequentes. A integridade do produto foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 0,8%, onde foi observada uma banda única no tamanho esperado de 3471 pb, sem a presença de fragmentos secundários ou contaminantes visíveis (Figura 2).

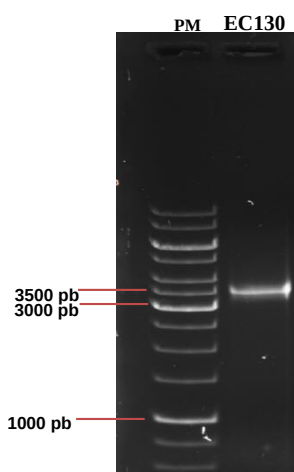


Figura 2. Purificação do produto de PCR do gene *cry9Aa1* (3471 pb). Amostras purificadas a partir do Qiaquick PCR Purification (QIAGEN), conforme manual do fabricante. PM refere-se ao Padrão Molecular 1kb DNA Ladder (GeneRuler™). Aplicação em gel de agarose, concentração 0,8% a 80V por ~1h30min.

Após a adição das extremidades 3' adeniladas (3'A) ao produto de PCR, foi realizada a etapa de clonagem utilizando o vetor pET-SUMO. A construção gênica *Cry9Aa1::pET-SUMO* foi inserida em células competentes de *E. coli* BL21(DE3). Posteriormente, os DNAs plasmidiais foram extraídos com sucesso das colônias resultantes, confirmando a eficiência do processo de clonagem (Figura 3).

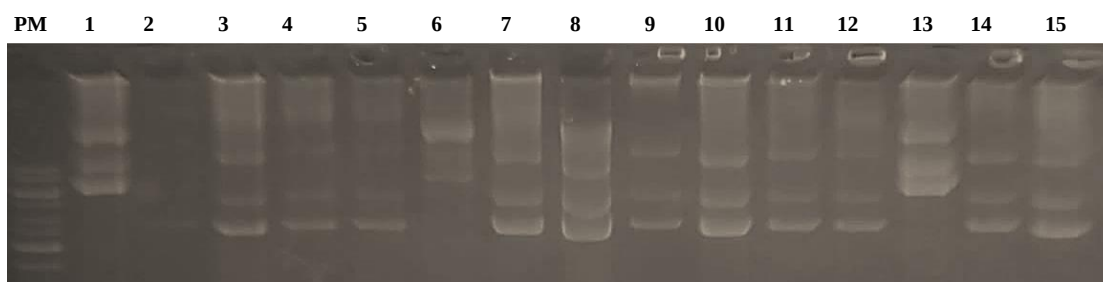


Figura 3. Eletroferograma referente aos DNAs plasmidiais dos clones transformantes do gene *cry9Aa1* em pET SUMO. PM: Marcador Molecular 1 kb DNA Ladder (GeneRuler™); 1 ao 15: transformação da estirpe *E. coli* BL21 (DE3) com *Cry9Aa1*::pET-SUMO. Aplicação em gel de agarose, concentração 0,8% a 80V por ~1h30min.

A introdução correta da construção gênica *Cry9Aa1*::pET-SUMO no sistema hospedeiro *E. coli* BL21(DE3) foi confirmada por meio de PCR com primers específicos para o gene de interesse. Entre os clones analisados, apenas três apresentaram amplificação positiva, indicando a presença do gene *cry9Aa1* na construção plasmidial (Figura 4). Esses resultados sugerem uma eficiência relativamente baixa no processo de clonagem, o que pode estar associado a diversos fatores técnicos ou biológicos. Entre as possíveis causas, destacam-se a integridade das extremidades 3'A, além da competência das células de *E. coli* utilizadas para internalizar a construção.

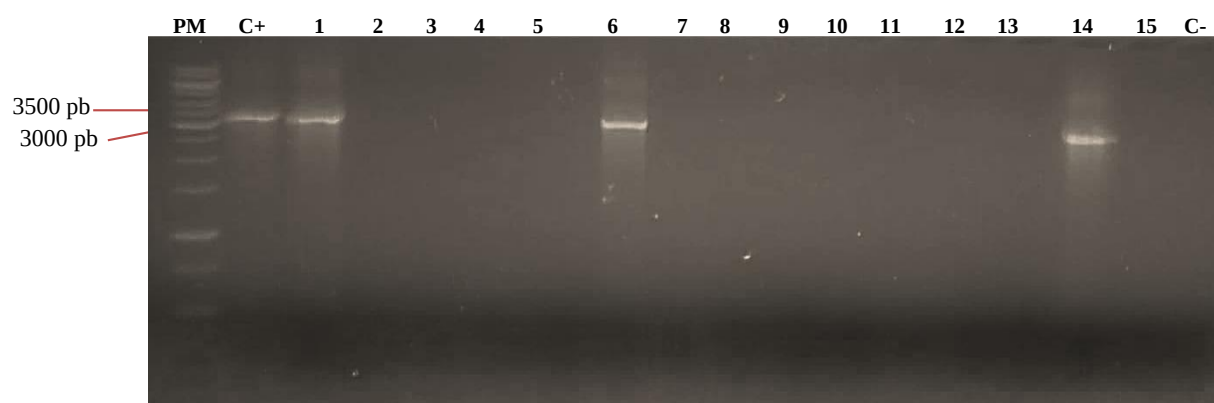


Figura 4. Eletroferograma referente aos DNAs plasmidiais dos clones transformantes do gene *cry9Aa1* em pET-SUMO. PM: Marcador Molecular 1 kb DNA Ladder (GeneRuler™); C+: DNA plasmidial do clone ECE130 (controle positivo); 2 ao 15: transformação da estirpe *E. coli* BL21 (DE3) com *cry9Aa1*::pET SUMO; C-: controle negativo (água estéril). Aplicação em gel de agarose, concentração 0,8% a 80V por ~1h30min.

A confirmação da orientação de leitura correta em relação ao promotor do vetor pET-SUMO foi realizada por meio de uma amplificação direcionada utilizando o primer SUMO F, presente no vetor, em combinação com o primer anti-senso específico do

gene *cry9Aa1*. O sucesso dessa abordagem foi demonstrado pela amplificação de uma banda única de 3471 pb, correspondente ao tamanho esperado do gene inserido (Figura 5).

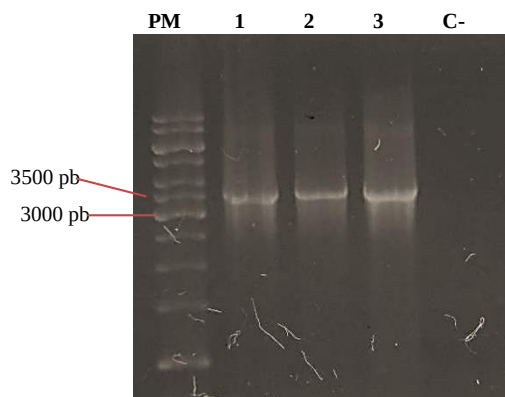


Figura 5. Eletroferograma para a confirmação da orientação de leitura correta em relação ao promotor do vetor para o gene *cry9Aa1* clonado em vetor de expressão pET-SUMO. PM: Marcador Molecular 1 kb DNA Ladder (GeneRuler™); 1 a 3: transformação da estirpe *E. coli* BL21 (DE3) com *cry9Aa1*::pET SUMO; C-: controle negativo (água estéril). Aplicação em gel de agarose, concentração 0,8% a 80V por ~1h30min.

Esse resultado confirma que o gene *cry9Aa1* foi inserido no vetor de forma orientada, permitindo a leitura adequada para transcrição e posterior expressão. A amplificação de uma banda única também evidencia a precisão do processo de clonagem, sem rearranjos ou inserções não específicas que poderiam comprometer o experimento. Além disso, a utilização do primer SUMO F, específico para a região do vetor, assegura que a amplificação ocorreu a partir da construção plasmidial e não de contaminantes ou DNA genômico.

A orientação correta do gene é crucial para garantir que a transcrição seja iniciada pelo promotor do vetor e que o mRNA resultante seja funcional. Isso é especialmente relevante em sistemas de expressão heteróloga, onde o alinhamento preciso entre o gene de interesse e os elementos regulatórios do vetor é essencial para a síntese proteica eficiente.

3.2 Obtenção das proteínas heterólogas

As proteínas heterólogas foram analisadas por SDS-PAGE quanto a sua integridade e estabilidade (Figura 6). Um clone de *E. Coli* BL21 (DE3) (Amostra 5) sem quaisquer construção gênica foi induzido e solubilizado, servindo como padrão negativo na análise por SDS-PAGE. A proteína Vip3Aa20, de 89 kDa, (Amostra 1), permanece íntegra, o que valida a importância da liofilização de proteínas purificadas que serão armazenadas por longos períodos. A proteína XnGroEL (Amostra 4) (58 kDa), uma chaperona nativa de *E. coli*, pôde ser facilmente expressa. A eficiência da

expressão pode ser visualizada em comparação ao controle negativo presente no SDS-PAGE.

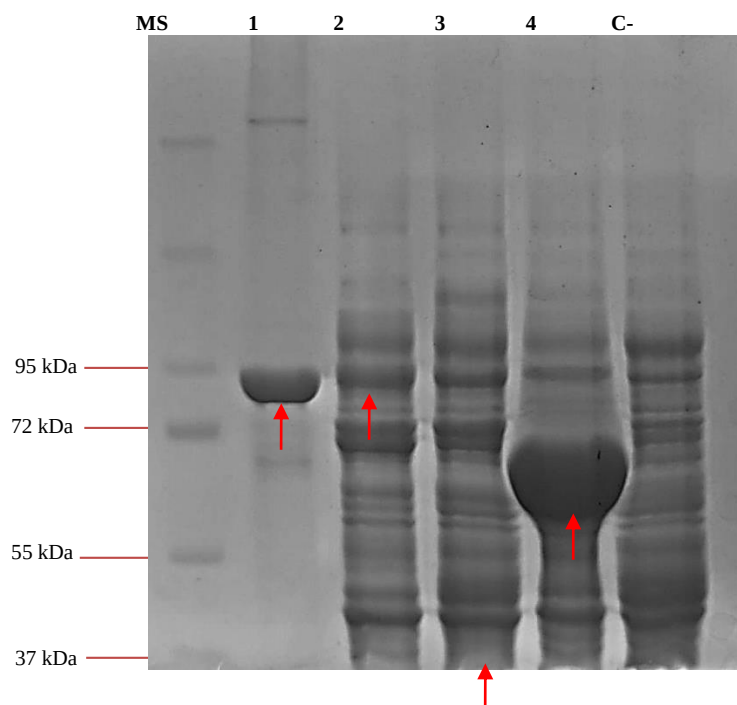


Figura 6. SDS-PAGE do lisado das proteínas Vip3Aa20, Chi, Tpx40 e XnGroel. A) MS: Marcador Marcador de massa molecular “Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder”, 1: proteína Vip3Aa20 (89 kDa), 2: Chi (87 kDa); 3: Tpx40 (37 kDa); 4: XnGroel (58 kDa) e 5: Controle negativo (clone de BL21 DE3 não transformado).

A eletroforese não detectou níveis significativos de proteínas solúveis ou funcionais para Chi (Amostra 2) e Tpx40 (Amostra 3). A baixa expressão da proteína Chi (87 kDa) foi justificada pela presença do peptídeo sinal, o que pode levar a proteína a ser secretada durante a sua extração (Augusto, 2014). A proteína Tpx40, embora tenha menor peso molecular e tende a ser mais compatível com a maquinaria de expressão de *E. coli*, apresentou uma expressão ineficiente em outro trabalho (Moreira, 2023). A Tpx40 é uma das proteínas que exercem patogenicidade na complexa relação simbiótica entre nematoides entomopatogênicos e suas bactérias associadas (Shankhu et al., 2019). Em condições naturais, alguns processos podem ser facilitados pela ação em cascata de metabólitos produzidos pela *X. nematophila*. Uma vez a proteína isolada em um sistema de expressão heterólogo, modificações pós-traducionais, como glicosilação, não são realizadas por *E. coli*, favorecendo a instabilidade estrutural e, conseqüentemente, na redução dos níveis de expressão.

4. Conclusão

A funcionalidade da construção *cry9Aa1:pET-SUMO* deve ser confirmada por

etapas posteriores, como o sequenciamento completo do plasmídeo e a expressão proteica.

A expressão proteica de Chi e Txp40 pode ser melhorada com a utilização de cepas de *E. coli* otimizadas para a solubilidade, como Rosetta (DE3) ou Origami (DE3), que oferecem vantagens como a expressão de chaperonas adicionais ou o ambiente oxidativo favorável à formação de pontes dissulfeto.

Embora a proteína XnGroel apresenta ótima expressão, a utilização dessa proteína só deve ser realizada após a purificação proteica.

5. Financiamento

Este trabalho não contou com financiamento, conforme previsto na modalidade de Pós-doutorado modalidade III. O desenvolvimento das atividades foi viabilizado por meio da gentileza da supervisora Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério, que forneceu os materiais de consumo e dispôs a estrutura física e operacional do Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada da FCAV-UNESP.

6. Nota Justificativa

A pós-doutoranda realizou entregas parciais dos resultados previstos no plano de trabalho do pós-doutorado devido à sua significativa dedicação a projetos paralelos, que trouxeram contribuições relevantes para a área de inovação e empreendedorismo da FCAV. Apesar de demonstrar interesse e empenho em concluir a pesquisa originalmente proposta, ela recebeu uma oportunidade de trabalho na empresa Conatus Ambiental, localizada em Mogi Guaçu. Por conta dessa oportunidade profissional e da impossibilidade de prorrogar o período do pós-doutorado, a finalização integral dos resultados planejados não foi viabilizada. A mudança de cidade e a adaptação à nova função impossibilitou a elaboração do relatório final e a consequente finalização do processo no SisPROPe no prazo máximo de um mês após a finalização do período de Pós-Doc, conforme estabelecido na Resolução UNESP Nº 12, de 04 de Abril de 2022.

Referências

AUGUSTO, Maria Laura Viola. **Caracterização do gene chi_I555 e propriedades bioquímicas da quitinase de *Bacillus thuringiensis***. 2014. 39p. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2014.

BARBOZA-CORONA, J. E. et al. Cloning, sequencing, and expression of the chitinase gene chiA74 from *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 2, p. 1023-1029, 2003.

BROWN, S. E. et al. Txp40, a ubiquitous insecticidal toxin protein from *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* bacteria. **Applied and environmental microbiology**, v. 72, n. 2, p. 1653-1662, 2006.

CTNBIO. Tabela de Plantas - Uso Comercial. Disponível em: <http://ctnbio.mcti.gov.br/liberacao-comercial/>. Acesso em: 08 mai. 2023.

CZEPAK, C. et al. First reported occurrence of *Helicoverpa armigera* (Hübner)(Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 43, jan./mar. 2013.

DHOLE, N. P.; DAR, M. A.; PANDIT, R. S. Recent advances in the bioprospection and applications of chitinolytic bacteria for valorization of waste chitin. **Archives of Microbiology**, v. 203, n. 5, p. 1953-1969, 2021.

FFRENCH-CONSTANT, R. H.; DOWLING, A.; WATERFIELD, N. R. Insecticidal toxins from *Photorhabdus* bacteria and their potential use in agriculture. **Toxicon**, v. 49, n. 4, p. 436-451, 2007.

GREEN, M. R.; SAMBROOK, Joseph. Molecular cloning. **A Laboratory Manual** 4th, 2012.

HAILE, F.; NOWATZKI, T.; STORER, N. Overview of Pest Status, Potential Risk, and Management Considerations of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) for U.S. Soybean Production, **Journal of Integrated Pest Management**, v. 12, n. 1, p. 1–10, jan. 2021.

HANAHAN, Douglas. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Journal of molecular biology**, v. 166, n. 4, p. 557-580, 1983.

IRAC. *Helicoverpa* – *Helicoverpa armigera*. Disponível em: < <https://www.irac-br.org/helicoverpa-armigera>>. Acesso em: 08 mai. 2023.

JOSHI, M. C. et al. An insecticidal GroEL protein with chitin binding activity from *Xenorhabdus nematophila*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 42, p. 28287-28296, 2008.

KUMARI, P. et al. A novel insecticidal GroEL protein from *Xenorhabdus nematophila* confers insect resistance in tobacco. **Transgenic research**, v. 23, n. 1, p. 99-107, 2014.

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

MARUCCI, S. C. et al. Relação entre toxicidade de proteínas Vip3Aa e sua capacidade de ligação a receptores intestinais de lepidópteros-praga. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 50, n. 8, p. 637-648, 2015.

POMARI-FERNANDES, A.; DE FREITAS BUENO, A.; SOSA-GÓMEZ, D. R. *Helicoverpa armigera*: current status and future perspectives in Brazil. **Current Agricultural Science and Technology**, v. 21, n. 1, p. 1-7, 2015.

QUAN, Y.; WU, K. Managing practical resistance of Lepidopteran pests to Bt cotton in China. **Insects**, v. 14, n. 2, p. 179, 2023.

SHANKHU, P. Y. et al. Txp40, a protein from *Photorhabdus akhurstii*, conferred potent insecticidal activity against the larvae of *Helicoverpa armigera*, *Spodoptera litura* and *S. exigua*. **Pest management science**, v. 76, n. 6, p. 2004-2014, 2019.

WANG, Z. et al. Specific binding between *Bacillus thuringiensis* Cry9Aa and Vip3Aa toxins synergizes their toxicity against Asiatic rice borer (*Chilo suppressalis*). **Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 29, p. 11447-11458, mar. 2018.

PARTE 2 - ATIVIDADES ACADÊMICAS, CIENTÍFICAS E TÉCNICAS

1. Artigos em fase de revisão por pares

SANTOS, T.N.F.; **MOREIRA, R.O.**; RODRIGUES, J.D.B.; ROJAS, L.A.C.; SOUZA, J.A.M.; DESIDÉRIO, J.A. Isolation and in silico analysis of a new subclass of parasporin 4 from *Bacillus thuringiensis coreanensis* and its potential biotechnological application. PeerJ, 2024.

2. Artigos publicados

RODRIGUES, J.D.B.; **MOREIRA, R.O.**; DE SOUZA, J.A.M.; DESIDÉRIO, J.A. Interaction of insecticidal proteins from *Pseudomonas* spp. and *Bacillus thuringiensis* for boll weevil management. Plos one, v. 18, n. 11, p. e0294654, 2023.

3. Trabalhos de Conclusão de Curso de Graduação

DESIDÉRIO, J.A.; **MOREIRA, R.O.**; CAMINHAS, A.M.T. Participação em banca de Ana Carolina Nolasco. O agronegócio sustentável da empresa de produtos orgânicos Native: Eco inovação e implementação da Agenda 2030. 2023. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Administração) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

GALLI, L.C.L.A.; **MOREIRA, R.O.**; JÚNIOR, W.B.F. Participação em banca de Amanda Maira Rosolem. Identificação dos pré-requisitos para abertura de um hub de inovação: avaliação da aptidão do município de Jaboticabal - SP. 2024. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

4. Participação em feiras e trabalhos de extensão

Expositora na VI Feira e XXI Encontro Nacional do Amendoim, 2024 – Estande Inova.Jab/APL do Agronegócio. Espaço para a divulgação aos produtores de amendoim, colaboradores corporativos, representantes políticos, acadêmicos e comunidade a respeito das startups incubadas na Inova.Jab e da importância do APL para Jaboticabal e região.

Expositora no XIV BioNativa, 2024. Estande do Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada. Espaço para a divulgação à comunidade a respeito das bactérias e seu papel diverso na biotecnologia.

Organização do IV Peanutech – Hackathon do Amendoim, 2024. Evento executado pela Inova.Jab durante a Feira Nacional do Amendoim com o objetivo de

criar soluções para a cadeia do amendoim.

5. Atividades técnicas e assessoria

A pós-doutoranda prestou serviço junto à empresa CROPEN Consultoria Agrícola LTDA., desenvolvendo atividades de pesquisa, com foco na otimização e análise de técnicas moleculares; elaboração de relatórios de resultados durante o desenvolvimento do projeto; solicitação e revisão de orçamentos, quando necessário e participação em reuniões relacionadas aos objetivos da parceria. O serviço foi intermediado pela Fundação de Apoio à Pesquisa, Ensino e Extensão – Funep, sob um orçamento de R\$16.200,00 e duração entre 10/2023 e 05/2024.

Desde 2021, a pós-doutoranda faz parte da equipe da Inova.Jab, Incubadora de Base Tecnológica da FCAV, executando ações para promoção ao empreendedorismo e inovação no câmpus e no ecossistema regional de Jaboticabal. Portanto, a organização e participação em reuniões, palestras, feiras, hackathons e demais eventos de networking eram realizadas. Entre 09/2022 e 09/2024, como uma das gestoras da Inova.Jab, a pós-doutoranda contribuiu no processo de seleção de empresas incubadas ([Formulário](#) e [Edital de Seleção](#)), avaliação das atividades de incubação de empresas e desenvolvimento de material e conteúdo relacionado à incubação e empreendedorismo para a Inova.Jab ([Manual do Incubado](#) e [Regimento Interno da Inova.Jab](#)).

Sob a supervisão do Prof. Dr. David Ferreira Lopes Santos, a pós-doutoranda contribuiu na elaboração do Projeto Completo, documento necessário para a formalização da Inova.Jab como um Ambiente de Inovação junto à Agência UNESP de Inovação (AUIN), em atendimento a Instrução Normativa AUIN 2 de 05 de julho de 2023. Além disso, a pós-doutoranda auxiliou na elaboração da documentação para o credenciamento da incubadora junto à Secretaria de Ciência, Tecnologia e Inovação do Estado de São Paulo, conforme Decreto Estadual nº 60.286, de 25 de março de 2014.

Sob a supervisão do Prof. Dr. Pedro Luís da Costa Aguiar Alves, a pós-doutoranda contribuiu na organização dos documentos para a habilitação jurídica da Funep como Organização da Sociedade Civil regida pelo Marco Regulatório das Organizações da Sociedade Civil (MROSC). Também liderou a elaboração da proposta técnica para a submissão ao Chamamento Público Nº 03/2023, publicado pela Secretaria Municipal de Indústria, Comércio e Turismo da Prefeitura Municipal de Jaboticabal. O chamamento visou o processo de seleção de uma organização da sociedade civil, sem fins lucrativos, cujas atividades sejam dirigidas à gestão do Arranjo Produtivo Local do Agronegócio do Município de Jaboticabal/SP, com um

orçamento total de R\$165.000,00 e duração entre 03/2024 e 03/2025.

Após o processo seletivo, a Funep foi outorgada e publicou uma chamada pública para contratação de bolsista para atuar como agente de governança no projeto. A pós-doutoranda foi selecionada no processo, ficando sob responsabilidade de desenvolver projetos para promoção e crescimento do arranjo; o desenho de eventos e ações para o networking entre as empresas; a visibilidade do APL/CPL e a regulamentação perante o Governo (estadual e municipal); incentivos e captação de recursos por meio de editais para arranjos produtivos locais/cadeias produtivas locais, sempre que necessário ou solicitado. O vínculo como bolsista foi executado de 10/07/2024 a 04/10/2024.