

BM21. Evolución dirigida de toxinas de *Bacillus thuringiensis* para el control del picudo del algodón (*Anthonomus grandis*) mediante la técnica de phage display

Pérez, M.P.* (1,2); Sauka, D.H. (2,3); Benintende, G.B. (2); Berretta, M.F. (2,3).

(1) Agencia Nacional de Promoción de la Investigación, el Desarrollo Tecnológico y la Innovación (Agencia I+D+i), Argentina. (2) Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMyZA), INTA, Argentina. (3) Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina. *perez.melisa@inta.gob.ar

El cultivo de algodón es perjudicado por diversas plagas, siendo el picudo del algodón, *Anthonomus grandis* B. (Coleóptera: Curculionidae), uno de los insectos que mayores daños provoca en Argentina. Su control está asociado principalmente al uso de insecticidas químicos, por lo cual la utilización de genes insecticidas de la bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis* para la generación de una variedad transgénica resistente a la plaga, podría constituir una alternativa de control ambientalmente sostenible. En trabajos previos se ha observado que *A. grandis* presenta baja susceptibilidad a toxinas Cry nativas producidas por *B. thuringiensis*. Para incrementar su toxicidad contra larvas del picudo se propone modificar dichas proteínas mediante evolución dirigida. La estrategia utilizada en este trabajo se centra en la utilización de una biblioteca de péptidos de secuencia arbitraria expresada en fagos, para seleccionar péptidos con capacidad de unirse a receptores de proteínas Cry en el intestino de *A. grandis*. Los péptidos seleccionados serán utilizados para modificar secuencias que corresponden a loops en la estructura de toxinas Cry nativas de tres dominios, que participan en la unión al receptor, y determinan su especificidad. En otros casos, se ha reportado que el aumento de la capacidad de unión de proteínas Cry a sus receptores, determina un incremento de su toxicidad.

La tecnología de expresión en fagos (phage display) aplicada a péptidos, consiste en la expresión de un péptido en la superficie de un fago, mediante la fusión de la secuencia nucleotídica que codifica para el péptido a expresar con el gen de una proteína de cubierta del fago. Mediante un screening basado en un proceso de selección por afinidad denominado "biopaneo", la población de fagos que expresan una biblioteca de péptidos de secuencia arbitraria, es enfrentada al blanco de interés a fin de capturar selectivamente los fagos de unión específica. En este trabajo se muestran resultados parciales del biopaneamiento de una biblioteca comercial de péptidos, fusionados en posición N-terminal a la proteína pIII de la cápside de un fago derivado del M13, contra vesículas de membrana del intestino (BBMVs) de larvas del picudo. Para la primera ronda de biopaneamiento, las BBMVs (20 µg de proteína) se enfrentaron al pool de fagos (10E11 pfu), y luego de sucesivos lavados, los fagos unidos fueron eluidos y amplificados mediante

infección de la cepa ER2738 de *E. coli*. El stock resultante fue titulado para continuar con sucesivas rondas de biopaneó. Se recuperaron varios clones, los cuales fueron secuenciados. Para identificar clones que se amplifiquen selectivamente debido a su especificidad de unión a receptores en las BBMV, se analizarán clones aislados a partir de nuevas rondas de biopaneó. Los resultados obtenidos a partir de la optimización de esta metodología nos permitirán disponer de secuencias de péptidos candidato para modificar la secuencia de proteínas Cry nativas.