

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E
EXPRESSÃO DE UM NOVO GENE *vip3Aa50* DE *Bacillus
thuringiensis* VIRULENTO PARA *Anticarsia gemmatalis* E
*Spodoptera frugiperda***

Camila Soares Figueiredo

Bióloga

2013

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E
EXPRESSÃO DE UM NOVO GENE *vip3Aa50* DE *Bacillus
thuringiensis* VIRULENTO PARA *Anticarsia gemmatalis* E
*Spodoptera frugiperda***

Camila Soares Figueiredo

Orientadora: Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do Título de Mestre em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas).

2013

Figueiredo, Camila Soares
F475i Isolamento, caracterização molecular e expressão de um novo gene *vip3aa50* de *Bacillus thuringiensis* virulento para *Anticarsia gemmatalis* e *Spodoptera frugiperda* / Camila Soares Figueiredo. -- Jaboticabal, 2013
xii, 46 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2013
Orientadora: Janete Aparecida Desidério
Banca examinadora: Ricardo Antonio Polanczyk, Janaína Fernandes Gonçalves
Bibliografia

1. Proteína inseticida vegetativa. 2. Lagarta da soja. 3. Lagarta do cartucho. 4. Controle biológico. 5. Expressão heteróloga. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 632.937

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

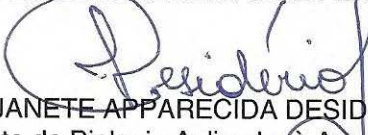
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E EXPRESSÃO DE UM NOVO GENE *vip3Aa50* DE *Bacillus thuringiensis* VIRULENTO PARA *Anticarsia gemmatalis* E *Spodoptera frugiperda*

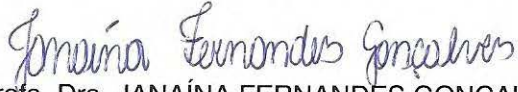
AUTORA: CAMILA SOARES FIGUEIREDO

ORIENTADORA: Profa. Dra. JANETE APPARECIDA DESIDERIO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM AGRONOMIA (GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. JANETE APPARECIDA DESIDERIO
Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Prof. Dr. RICARDO ANTONIO POLANCZYK
Departamento de Fitossanidade / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Profa. Dra. JANAÍNA FERNANDES GONÇALVES
Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri / Diamantina/MG

Data da realização: 25 de fevereiro de 2013.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Camila Soares Figueiredo - nasceu em 16 de maio de 1988 em Jaboticabal - SP. Ingressou no curso de Ciências Biológicas pela Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Câmpus de Jaboticabal em 2007, concluindo o curso de Bacharel em dezembro de 2010. Entre março de 2008 e novembro de 2009, realizou treinamento em iniciação científica, no Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada do Departamento de Biologia Aplicada a Agropecuária da FCAV-UNESP. Foi bolsista de iniciação científica pela agência de fomento a pesquisa FAPESP, defendendo o trabalho de conclusão de curso intitulado “Identificação e caracterização de genes *vip3* em isolados de *Bacillus thuringiensis* e avaliação da toxicidade a larvas de *Anticarsia gemmatalis* e *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)” orientada pela Profª Drª Janete Aparecida Desidério em 2010. Em 2011, iniciou o mestrado na área de Genética e Melhoramento de Plantas pela FCAV-UNESP, desenvolvendo sua pesquisa na área de controle biológico com uso da bactéria *Bacillus thuringiensis*, utilizando no estudo ferramentas de biologia molecular.

Email: camila_sfigueiredo@hotmail.com

Para todos aqueles que dedicam á vida em
Prol da melhoria de vida da sociedade.

Para minha mãe, meu pai, meus irmãos e amigos.

“Feliz é aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina...”.

(Cora Coralina)

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Câmpus de Jaboticabal, e principalmente aos membros dos Departamentos de Biologia Aplicada à Agropecuária;

À **Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério** pela orientação e confiança durante todo o período do desenvolvimento deste trabalho;

Ao **Prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos** pelo apoio e atenção dedicados;

Ao **Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro** pela disponibilidade da infraestrutura do Laboratório de Bioinformática do CREBIO (Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica) da UNESP Câmpus de Jaboticabal, em conjunto com a equipe de Bioinformática deste centro em especial **Renata Izabel Dozzi Tezza**;

Aos membros da banca de avaliação da qualificação e defesa pelas sugestões, que contribuíram para o aperfeiçoamento deste trabalho;

Aos membros do Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA) do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária;

À Gravena Ltda de Jaboticabal pela concessão de posturas de *Anticarsia gemmatalis* e *Spodoptera frugiperda*;

À **Fapesp** pela concessão da bolsa de estudo (Proc: 2011/05328-9);

À todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 <i>Bacillus thuringiensis</i> e suas toxinas	4
2.2 <i>Anticarsia gemmatalis</i>	7
2.3 <i>Spodoptera frugiperda</i>	9
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1 Condições de cultivo bacteriano	11
3.2 Extração de DNA total	11
3.3 Amplificação do gene <i>vip3A</i>	12
3.4 Clonagem do gene <i>vip3A</i> em vetor pGEM –T Easy	13
3.5 Transformação bacteriana	13
3.6 Extração do DNA plasmidial	14
3.7 Sequenciamento do gene <i>vip3A</i>	15
3.8 Análise dos dados gerados por meio do sequenciamento	16
3.9 Clonagem do gene <i>vip3Aa</i> no vetor pET - 28a	17
3.10 Expressão da proteína Vip3A em <i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	19
3.11 Detecção da proteína Vip3A por “Western blotting”	20
3.12 Bioensaios com <i>Anticarsia gemmatalis</i> e <i>Spodoptera frugiperda</i>	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
5. CONCLUSÕES	37
6. REFERÊNCIAS	38

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1. Iniciadores utilizados no sequenciamento	16
TABELA 2. Virulência de larvas neonatas de <i>S. frugiperda</i> e <i>A. gemmatalis</i> à pró-toxina Vip3Aa50	34

LISTA DE FIGURAS

	Página
<p>FIGURA 1. Eletroforograma evidenciando fragmento com aproximadamente 2370 pb correspondente ao gene <i>vip3A</i> amplificado por PCR, utilizando o par de oligonucleotídeos iniciadores VIP5-VIP6 em gel de agarose 0,8%. MM: marcador de massa molecular 1kb DNA “ladder” (Fermentas); 1: Isolado 131; 2: <i>B. thuringiensis</i> var. <i>tolworthi</i> (controle positivo) e 3: <i>B. thuringiensis</i> var. <i>tenebrionis</i> (controle negativo)</p>	23
<p>Figura 2. Eletroforograma evidenciando fragmento com aproximadamente 2600 pb correspondente a amplificação da região de clonagem do vetor pGEM T-Easy e gene <i>vip3A</i> clonado, utilizando-se o par de oligonucleotídeos iniciadores T7-SP6 em gel de agarose 0,8%. MM: marcador de massa molecular 1kb DNA “ladder” (Fermentas); 1-20: clones selecionados de <i>E. coli</i> DH 10B</p>	24
<p>FIGURA 3. Eletroforograma evidenciando fragmento com aproximadamente 2370 pb correspondente a amplificação do gene <i>vip3A</i> clonado no vetor pGEM T-Easy, utilizando-se o par de iniciadores VIP5-VIP6 em gel de agarose 0,8%. MM: marcador de massa molecular 1kb DNA “ladder” (Fermentas); 1-20: clones selecionados de <i>E. coli</i> DH 10B</p>	25
<p>FIGURA 4. Alinhamento da sequência do gene <i>vip3Aa50</i> obtida a partir do isolado I131 de <i>B. thuringiensis</i> realizado dia 30 de janeiro de 2013, utilizando o algoritmo BlastX da ferramenta Blast, disponível publicamente na página do NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)</p>	26
<p>FIGURA 5. Eletroforograma da reação de restrição utilizando a enzima <i>NotI</i> em gel de agarose 1,5%. MM: marcador de massa molecular 1kb DNA “ladder” (Fermentas); (A) DNA plasmidial do clone C-20, contendo o gene <i>vip3Aa50</i> (2,37 Kb) proveniente do isolado 131 clonado no vetor pGEM T-Easy (3 Kb); pET-28a (+) (5,3Kb)</p>	29

- FIGURA 6. Eletroforograma evidenciando fragmento com aproximadamente 2600 pb correspondente a amplificação da região de clonagem do vetor pET-28a (+) com o gene *vip3A* clonado e 250 pb pET-28a recircularizado, utilizando-se o par de oligonucleotídeos iniciadores T7 promoter-T7 terminator em gel de agarose 0,8%. MM: marcador de massa molecular 1kb DNA “ladder” (Fermentas); 1-19: clones selecionados de *E. coli* DH 10B 30
- FIGURA 7. Sequência parcial de nucleotídeos do gene *vip3Aa50* clonado no vetor pET-28a (+) do clone 1 de *E. coli* DH10B. Em vermelho, está a sequência do vetor pET-28a (+), sendo a hexa-histidina grifada. Em amarelo, está destacada a sequência inicial do gene *vip3Aa50*, sendo grifado o códon de início, ATG, do gene *vip3Aa* (metionina inicial) 31
- FIGURA 8. Eletroforograma evidenciando fragmento com aproximadamente 2370 pb correspondente a amplificação do gene *vip3A* clonado no vetor pET-28a (+), utilizando-se o par de oligonucleotídeos iniciadores VIP5-VIP6 em gel de agarose 0,8%. MM: marcador de massa molecular 1kb DNA ladder (Fermentas); 1-110: clones selecionados de *E. coli* BL 21 (DE3) 31
- FIGURA 9. Gel de SDS-PAGE do lisado bacteriano da *E. coli* portadora do vetor pET-28a (+) contendo o gene *vip3Aa50* M: marcador de massa molecular (kDa) “Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder” (Fermentas). 1. lisado de *E. coli* obtido da cultura não induzida. 2. lisado de *E. coli* obtido da cultura induzida, contendo uma proteína de aproximadamente 88 kDa 32
- FIGURA 10. “Western blotting” do lisado bacteriano da *E. coli* portadora do vetor pET-28a contendo o gene *vip3Aa50* M: marcador de massa molecular (kDa) “Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder” (Fermentas). 1. Lisado de *E. coli* obtido da cultura induzida. 2. Lisado de *E. coli* obtido da cultura não induzida, presença em 1 e 2 a reação da proteína de aproximadamente 88 kDa com o anticorpo anti-histidina 33

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E EXPRESSÃO
DE UM NOVO GENE *vip3Aa50* DE *Bacillus thuringiensis*
VIRULENTO PARA *Anticarsia gemmatalis* E *Spodoptera frugiperda***

Resumo - A bactéria *Bacillus thuringiensis* é vista como uma das melhores opções no controle biológico devido à ação entomopatogênica e a especificidade de suas proteínas. As proteínas Vip3, que são secretadas durante o crescimento vegetativo do *B. thuringiensis*, atuam no controle de importantes lepidópteros praga. O objetivo deste trabalho foi caracterizar um gene *vip3A* de um isolado de *B. thuringiensis*, expressar a proteína e verificar sua toxicidade contra larvas de *Anticarsia gemmatalis* e *Spodoptera frugiperda*. Para tanto, o gene foi amplificado com iniciadores específicos por PCR, gerando um fragmento de 2370 pb. O fragmento foi clonado em vetor pGEM - T Easy para sequenciamento, subclonado em vetor de expressão pET-28a (+) e o conjunto inserido em células de *Escherichia coli* BL21 (DE3). A expressão da proteína foi induzida por IPTG, a proteína Vip3Aa50 foi visualizada em SDS-PAGE e detectada por “Western blotting”. Os ensaios de toxicidade revelaram alta virulência às larvas neonatas de *A. gemmatalis* e *S. frugiperda*, sendo as larvas da população de *A. gemmatalis* mais sensíveis. O isolado utilizado neste estudo é altamente promissor como fonte de gene *vip3A* para controle de ambas as pragas por meio da produção de plantas transgênicas como milho e soja.

Palavras-chave: controle biológico, expressão heteróloga, lagarta do cartucho, lagarta da soja, proteína inseticida vegetativa

**ISOLATION, MOLECULAR CHARACTERIZATION AND EXPRESSION OF THE
vip3Aa50 GENE FROM *Bacillus thuringiensis* VIRULENT TO *Anticarsia
gemmatalis* AND *Spodoptera frugiperda***

Abstract - The bacterium *Bacillus thuringiensis* is seen as one the best options for the biological control due to entomopathogenic action and protein specificity. The Vip3 proteins, which are secreted during the vegetative growth of *B. thuringiensis*, act to the control the most important lepidopteran pests. The aim of this study was to characterize a *vip3A* gene from an isolate of *B. thuringiensis*, to induce the protein and evaluate its toxicity against *Anticarsia gemmatalis* and *Spodoptera frugiperda* larvae. Therefore, the gene was amplified by specific PCR's primers, generating a 2370 pb fragment. The fragment was cloned into the pGEM-T Easy vector and subsequently, it was sequenced and subcloned into the pET-28a (+)'s expression vector and inserted in to the *Escherichia coli* BL21 (DE3) cells. The Vip3Aa50 protein expression was induced by IPTG, observed using SDS-PAGE and detected by Western blotting. The toxicity bioassay showed intense virulence for *A. gemmatalis* and *S. frugiperda*'s neonate larvae. The results showed that *A. gemmatalis* larval population was more sensitive. The isolate used in this study is highly promising as *vip3A* source gene to control both plagues through transgenic plant production, such as, corn and soybean.

Keywords: *Anticarsia gemmatalis*, biological control, heterologous expression *Spodoptera frugiperda*, vegetative insecticidal protein

1. INTRODUÇÃO

A produção agrícola depende da interação de fatores abióticos e bióticos, ou seja, inerentes a condições climáticas e de cultivo. Os insetos desfolhadores causam grandes prejuízos, reduzindo a área foliar responsável pelos processos fotossintéticos e, assim, a produção.

A lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis*) reduz a produção de grãos de soja (*Glycine max*), por meio do consumo de folhas de soja (MENDONÇA et al., 2011). E a lagarta do cartucho (*Spodoptera frugiperda*) alimenta-se do cartucho do milho (*Zea maiz*), gerando prejuízos da ordem de 37% (MENDES et al., 2008).

Os inseticidas químicos de amplo espectro são muito utilizados na agricultura para o controle destas pragas. A intensificação de aplicações dos inseticidas, a fim de se manter os níveis satisfatórios de produção, pode levar à emergência de populações resistentes e à eliminação de inimigos naturais, que favorecem o surgimento de pragas secundárias, além de contribuir para a contaminação do ambiente.

O uso racional dos agroecossistemas faz se necessário para redução dos impactos ambientais causados pelo uso de defensivos químicos na agricultura. O Manejo Integrado de Pragas (MIP) preconiza a diversificação do uso de técnicas no controle dos insetos através do controle físico, biológico e, se necessário, o químico.

A bactéria *Bacillus thuringiensis* Berliner é amplamente utilizada no controle biológico a mais de 50 anos. Os produtos baseiam-se em δ -endotoxinas (proteínas Cry) sintetizadas pelo *B. thuringiensis* durante sua esporulação. Essas proteínas atuam no controle de insetos e alguns nematóides. As toxinas Cry possuem grande especificidade não atingindo inimigos naturais do inseto alvo (BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2007).

B. thuringiensis sintetiza proteínas com capacidade inseticida também durante a fase vegetativa de multiplicação. As proteínas inseticidas vegetativas, Vip, são secretadas em uma forma solúvel e apresentam toxicidade a insetos de importância agrônômica. A toxina binária Vip1 e Vip2 atuam no controle de algumas espécies das ordens Coleoptera (WARREN, 1997) e Hemiptera

(SAMPURNA & MAITI, 2011) e as proteínas da família Vip3A controlam algumas espécies da ordem Lepidoptera (ESTRUCH et al., 1996), até o momento não há relatos na literatura sobre a ação inseticida da Vip4.

Essas toxinas possuem enorme potencial na aplicação contra insetos insensíveis ou resistentes às proteínas Cry, pois, atuam em receptores de reconhecimento diferentes no intestino médio do inseto (LEE; MILES; CHEN, 2006). A combinação dos genes *vip* e *cry* sendo expressos, simultaneamente, por meio de engenharia genética pode potencializar a atividade inseticida, retardar ou impedir o surgimento de populações de pragas alvos resistentes à ação das proteínas (CHANKHAMHAENGDECHA; TANTICHODOK; PANBANGRED, 2008; CHEN et al., 2010)

As proteínas da classe Vip3 demonstram toxicidade a um amplo espectro de lepidópteros (ESTRUCH et al., 1996), sendo que a alteração de aminoácidos, que caracterizam as diferentes subclasses destas toxinas, pode causar efeito significativo sobre a atividade inseticida das mesmas (SHEN et al., 2009). A ação inseticida das proteínas Vip3 parece se diferenciar de uma espécie para outra de lepidópteros (ABDELKEFI-MERASTI et al., 2011).

Entretanto, o potencial das Vips, inerente ao controle de insetos, não tem sido amplamente explorado se comparada às proteínas Cry que apresentam um número superior de toxinas descritas e insetos testados. A busca de novos isolados genes, a caracterização molecular dos mesmos, aliada aos ensaios de eficiência de toxicidade, são de suma importância para explorar a aplicação desta nova classe de toxinas de *B. thuringiensis*.

FIGUEIREDO (2010) objetivou-se identificar a presença do gene *vip3Aa* a partir de 1080 isolados brasileiros de *B. thuringiensis* pertencentes ao LGBBA. Neste trabalho foi possível detectar a presença do gene *vip3Aa* em 55 isolados sendo estes, posteriormente, avaliados quanto a toxicidade a larvas neonatas de *S. frugiperda* e *A. gemmatalis* por meio de bioensaios de superfície com o sobrenadante da cultura. Dos 55 isolados analisados, 49% apresentaram toxicidade alta ou média a estas larvas. No entanto, o isolado 131 destacou-se por apresentar letalidade de 100 % às duas espécies.

Neste sentido, este trabalho teve como objetivo estudar o isolado I131 de *B. thuringiensis* portador de um gene *vip3A*, por meio do sequenciamento deste gene, expressão e ensaio de toxicidade com larvas neonatas de *S.*

frugiperda e *A. gemmatalis*, a fim de se verificar o potencial deste como fonte de gene *vip3* na produção de plantas transgênicas de milho e soja resistentes ao ataque de ambas as pragas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Bacillus thuringiensis* e as proteínas Vip 3

A bactéria *B. thuringiensis* (Bt) é gram-positiva, aeróbia facultativa, quimioheterotrófica, com temperatura ideal de multiplicação “in vitro” de 30 °C. Possui forma de bastonete, sob condições específicas, em geral desfavoráveis ao seu crescimento, desenvolve um ciclo de esporulação típico dos bacilos.

Foi isolada pela primeira vez por um cientista japonês, S. Ishiwata, em 1902 a partir de larva de bicho da seda, *Bombix mori*. Porém, descrita apenas na década seguinte por Berliner que fez o isolamento a partir de lagartas da traça da farinha, *Anagasta kuehniella*, coletadas na Alemanha na região de Thuringia. (GLARE & O' CALLAGHAN, 2000).

B. thuringiensis tem sido encontrado em amostras de solo, grãos armazenados, insetos mortos e superfícies de plantas. Possui vários fatores de virulência como as toxinas Cry, Cyt, α -exotoxinas, β -exotoxinas, hemolisinas, enterotoxinas, quitinases e fosfolipases (DE MAAGD et al., 2001) e as proteínas de segunda geração denominadas de Vip, proteínas inseticidas vegetativas (ESTRUCH et al., 1996).

No momento de sua esporulação, a bactéria produz inclusões cristalinas, que contém uma série de proteínas (δ -endotoxinas) com atividade inseticida como as proteínas Cry e Cyt. Os bioinseticidas baseados nestas toxinas são os mais empregados. As formulações a base do *B. thuringiensis* são comercializadas, no mundo todo, há mais de 50 anos (DIAS et al., 2002), sendo que este bacilo detém de 2% do mercado de inseticidas (BRAVO et al., 2011). Os produtos à base de *B. thuringiensis* são inócuos a mamíferos e não são poluentes, devido a sua grande especificidade, não atingem os inimigos naturais do inseto alvo (SMITS 1997).

Esta bactéria destaca-se pelo amplo espectro de ação e atua no controle de insetos das ordens Lepidoptera, Diptera, Coleoptera e alguns nematóides (BRAVO A.; GILL S. S; SOBERÓN M, 2007). Porém, existem relatos de insetos que se tornaram resistentes às proteínas Cry e insetos para os quais não foi

relatada uma proteína eficaz (TABASHNIK, 1994; DE MAAGD; BOSCH; STIEKEMA, 1999). Os mecanismos de resistência têm sido descritos em várias das etapas do modo de ação como alterações no sítio de ligação à BBMV ("Brush Border Membrane Vesicles"), alterações na atividade proteolítica no aparelho digestivo do inseto e até aumento da velocidade de regeneração do tecido epitelial do intestino. Contudo, a redução das ligações da proteína aos receptores nos intestinos dos insetos alvos destaca-se dentre estes mecanismos (FERRÉ; VAN RIE, 2002). A resistência apresentada por insetos a algumas toxinas Cry não representa uma ameaça imediata a tecnologia de plantas Bt, haja vista que muitas toxinas com a atividade a pragas não foram colocadas em plantas e ainda há possibilidade de pirimidização de genes (BRAVO et al., 2011).

A busca por genes com atividade inseticida em isolados de *B. thuringiensis* por meio da "Polymerase Chain Reaction" (PCR) tornou-se rotina em estudos de caracterização e isolamento (CAROZZI et al., 1991; CERÓN et al., 1995; VIDAL-QUIST et al., 2009). Além da detecção de genes *vip3*, em cepas de *B. thuringiensis*, tem sido aliada a esta técnica o "Restriction Fragment Length Polymorphism" RFLP para busca de novos genes (LIU et al., 2007; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ et al., 2009; SAUKA; RODRIGUEZ; BENINTENDE, 2013). A classe de genes *vip3* mostrou-se mais abundante se comparado às classes de genes *vip1* e *vip2* no banco de isolados da China qual foi rastreado objetivando a seleção de novos genes para o controle de lepidópteros pragas (YU et al., 2011). A subclasse *vip3A* tem sido identificada com maior frequência nas análises de polimorfismo dentro da classe Vip3 (BEARD et al., 2008).

As proteínas Vip são secretadas durante o crescimento vegetativo do *B. thuringiensis* (ESTRUCH et al., 1996). Atualmente, existem mais de 60 sequências de genes *vip* descritas as quais estão classificadas em quatro diferentes famílias: Vip1, Vip2, Vip3 e Vip4 .

A toxina binária Vip1(100 kDa) e Vip2 (52 kDa) tem ação conjunta mas com funções individuais. Apresentam atividade inseticida a larvas de insetos de algumas espécies da ordem Coleoptera e de algumas ninfas de espécies da ordem Hemiptera (WARREN et al., 1996; SAMPURN; MAITI, 2011). O peptídeo Vip1 possui funções relacionadas à translocação e a ligação à receptores no

inseto e Vip2 função enzimática. A ligação da toxina binária a um receptor de 50 kDa na microvilosidade da membrana do intestino médio de afídeos do algodão (*Aphis gossypii*) foi comprovada por ensaios de união por meio de ligante “blotting” (SAMPURNA; MAITI, 2011).

As proteínas do tipo Vip3 foram divididas em quatro classes (Vip3A, Vip3B e Vip3C) e onze subclasses (Vip3Aa à Vip3Ai, Vip3Ba à Vip3Bb e Vip3Ca) (http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/vip.html). Atuam no controle larvas de insetos da ordem Lepidoptera (ESTRUCH et al., 1996). A sequência de aminoácidos destas toxinas não compartilha homologia com quaisquer outras δ -endotoxinas conhecidas e tem demonstrado um amplo espectro inseticida (DOSS et al., 2002; MESRATI; TOUNSI; JAOUA, 2005). O gene *vip3A* codifica uma proteína de 88,5 kDa que é secretada no sobrenadante de culturas do *B. thuringiensis* (ESTRUCH et al., 1996).

A ação da proteína Vip3A tem sido examinada e mostra estar ao nível do epitélio intestinal do inseto, assim como as proteínas Cry, que após ligarem-se a receptores de células intestinais de insetos suscetíveis provocam uma progressiva degeneração da camada epitelial (YU et al., 1997), sendo assim, a ação das proteínas Vip se assemelha à ação das proteínas Cry.

As proteínas Vip são sintetizadas como pró-toxinas, sofrem solubilização no ambiente alcalino do intestino do inseto (pH 10) e são processadas por proteases específicas transformando-as em toxinas ativas. Ligam-se a receptores específicos, levando à formação de canais iônicos estáveis (LEE et al., 2006) e, em sequência, à lise das células, o que causa uma progressiva degeneração da camada epitelial. Este é o principal mecanismo de letalidade das toxinas (YU et al., 1997). Esses processos têm como consequência a parada alimentar e/ou septicemia, levando as larvas à morte.

Abdelkefi-Mesrati et al. (2011), apresentaram o efeito histopatológico causado pela proteína Vip3Aa16 no intestino médio de lagartas da espécie *S. littoralis*. Foram observados efeitos como formação de vesículas na região apical e ruptura das células epiteliais provocando extravazamento de material para o lúmen. Efeitos semelhantes foram demonstrados por Raussel et al. (2000) observando o epitélio intestinal de lagartas da espécie *Lymantria monacha* alimentadas com dieta contendo as proteínas Cry1A e Cry1Ac. A desorganização e lise celular foram visualizadas também em lagartas de *A.*

gemmatalis e *S. frugiperda* alimentadas com dieta tratada com *B. thuringiensis kurstaki* HD-1 e HD-73 respectivamente (KNAAK, et al., 2010; KNAAK; FIUZA, 2005). Assim, os prejuízos causados a células do intestino médio a insetos suscetíveis tem se mostrado semelhantes para as toxinas Cry e Vip3, sendo estes processos degenerativos responsáveis pela morte do inseto.

A ligação a receptores do epitélio intestinal médio é uma etapa fundamental na ação das proteínas Cry e Vip. A toxina Vip3A e a Cry1Ac reconhecem receptores de diferentes tamanhos na BBMV de lagartas da espécie *Prays oleae*, sendo respectivamente de 65 e 210 kDa (ABDELKEFI-MESRATI et al., 2009). Por meio de “ligand blotting” foi identificado também um receptor putativo de 65 kDa nas lagartas das espécies *S. frugiperda*, *Spodoptera albula*, *Spodoptera cosmioides* e *Spodoptera eridania* para a toxina Vip3A isolada a partir da linhagem de *B. thuringiensis* HD-1 (BERGAMASCO et al., 2013). Mas os receptores para as proteínas podem se diferenciar em função das espécies de lepidópteros estudados. Abdelkefi-Mesrati et al. (2011) verificaram a ligação da proteína Vip3Aa16 a receptores de 55 e 100 kDa para as lagartas da espécie *Spodoptera littoralis*. Em lagartas de *Manduca sexta*, a proteína Vip3A liga-se a receptores de 80 e 100 kDa (LEE et al., 2003), sendo, assim, os receptores de tamanhos diferentes de descritos na literatura para as proteínas Vip3 em outras espécies.

As proteínas Vip3A possuem atividade inseticida contra insetos-praga de importância agrônômica da ordem Lepidoptera como pragas do milho e algodão (FANG et al., 2007) e revelam alta bioatividade para: lagarta do cartucho (*S. frugiperda*) (SENA; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ; FERRÉ, 2009), lagarta rosca (*Agrotis ipsilon*), lagarta da beterraba (*Spodoptera exigua*) (ESTRUCH et al., 1996), lagarta da maçã (*Heliothis virescens*), lagarta da espiga (*Helicoverpa zea*) (DOSS et al., 2002), lagarta do algodão (*Helicoverpa armigera*) (BEARD et al., 2008). As Vip3A apresentam maior toxicidade contra vários lepidópteros quando comparadas às proteínas Cry1 (ESTRUCH et al., 1996; DONOVAN et al., 2001).

2.2 *Anticarsia gemmatalis*

A lagarta da soja (*A. gemmatalis*) acarreta grandes prejuízos para a cultura da soja (*Glycine max*) (HOFFMANN-CAMPO et al., 2003), promovendo uma significativa perda na produção de grãos. Segundo Panizzi e Corrêa-Ferreira (1997) a forma imatura da *A. gemmatalis*, popularmente conhecida como lagarta da soja, é a mais importante espécie, dentre as lagartas desfolhadoras, que ocorre na cultura da soja no Brasil. As lagartas de *A. gemmatalis* alimentam-se das folhas de soja, destruindo tanto o limbo como as nervuras podendo causar desfolhamento de até 100% (SILVA, 1995).

Esta lagarta é a principal praga da cultura da soja, principalmente na região sul. Populações muito elevadas deste inseto podem causar danos severos por meio do desfolhamento. A fase de lagarta dura em torno de duas semanas e o inseto consome, aproximadamente, 100 cm² de área foliar, equivalente a três folíolos de soja (GALLO et al., 2002).

A. gemmatalis possui metamorfose completa, ou seja, seu ciclo biológico envolve as fases de ovo, larva, pupa e adulto. Os ovos são depositados pela fêmea na parte inferior das folhas, no caule, nos ramos e nos pecíolos. O período de incubação da larva é de três dias. Nos 1° e 2° ínstars, as larvas raspam o parênquima foliar e a partir do 3° instar conseguem perfurar as folhas, sendo 4°, 5° e 6° ínstars das fases larvais responsáveis por 96% do consumo de massa foliar.

O controle da lagarta da soja é realizado com produtos químicos e também com produtos biológicos à base de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk) (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000). A linhagem expressa as toxinas inseticidas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa (SOBERÓN et al., 2009).

A lagarta da soja apresenta susceptibilidade comprovada a algumas das proteínas cristais das classes Cry1, Cry2, Cry9. Já foram desenvolvidas várias linhagens de soja transgênica carregando genes Cry1 de *B. thuringiensis* com o objetivo de diminuir o desfolhamento causado por lepidópteros. Estas plantas contêm genes modificados e expressam proteínas com capacidade inseticida que conferem resistência a soja ao ataque das lagartas (SCHENKEL, et al., 2008; MCPHERSON e MACRAE, 2009).

A eficácia da proteína Cry1, no controle lagarta da soja, é observada sob condições de campo em culturas de soja Bt e em laboratório por meio da incorporação do liofilizado foliar a dieta artificial (MACRAE et al., 2005). A

proteína Cry2A, de 65 kDa, expressa de maneira heteróloga por baculovírus *Autographa californica nucleopoliedrovirus* múltipla (AcMNPV) recombinante apresentou atividade tóxica lagartas de *A. gemmatalis* a lagartas de segundo instar, resultando uma CL_{50} de $1,03 \text{ ug.mL}^{-1}$ (LIMA et al., 2008). A linhagem *B. thuringiensis* cepa japonensis sorovar S725, também apresenta atividade inseticida a lagarta da soja, motivando pesquisas referentes ao seu conteúdo proteico visando o controle desta lagarta. Esta estirpe expressa as proteínas solúveis Cry1I e Vip3, além da proteína Cry9Bb de 130 kDa. A Cry9Bb apresenta atividade inseticida a *A. gemmatalis* comprovada (SILVA-WERNECK; ELLAR, 2008).

A CTNBio liberou em 2010 o evento referente a soja Bt, Intacta RR2 Pro™ que carrega o gene Cry1Ac, atuando, no controle da lagarta da soja e a falsa medideira (*Pseudoplusia includens*).

2.3 *Spodoptera frugiperda*

A lagarta do cartucho (*S. frugiperda*) causa perdas nas lavouras de milho (*Zea mays*), sendo um dos principais desfolhadores, reduz a produção na ordem de 34% (MENDES et al., 2008), *S. frugiperda*, em sua fase larval, destaca-se pelos grandes prejuízos causados a culturas de importância econômica como milho, algodão, arroz, amendoim, feijão, sorgo e trigo (CRUZ; MONTEIRO, 2004).

As mariposas possuem hábitos noturnos e fazem posturas durante a noite, ovipositando sobre folhas de milho (GALLO et al., 2002). Este inseto apresenta metamorfose completa. Os ovos passam por um período de incubação, variando de acordo com as condições ambientais de temperatura. Após a eclosão as lagartas alimentam-se raspando folhas e com o desenvolvimento migram para o cartucho da planta (GRÜTZMACHER; MARTINS; CUNHA, 2000).

A lagarta demonstra preferência por cartuchos jovens, alimentando-se em todas as fases do crescimento vegetal e, em razão do canibalismo característico da espécie, é comum encontrar apenas uma lagarta por cartucho (CRUZ et al., 1996).

O controle dessa praga tem sido feito, basicamente, com o uso de inseticidas sintéticos, sendo necessárias pesquisas com metodologias alternativas que ofereçam menor risco para o ambiente (PRATES; VIANA; WAQUIL, 2003).

As lagartas de *S. frugiperda* tem apresentado suscetibilidade as toxinas Vip3A, sendo esta superior à observada para as Cry1, como descrito por Sena, Hernández-Rodríguez e Ferré, (2009) para as pró-toxinas Vip3Aa e Vip3Af comparadas com as Cry1Ab e Cry1Fa. Recentemente foi relatado um caso de resistência de lagartas de *S. frugiperda* a Milho transgênico expressando a proteína Cry1F em Porto Rico. A herança da resistência neste caso se mostrou autossômica recessiva (STORER et al., 2010). Os eventos de milho YieldGard® MON810 (Cry1Ab) , Agrisure® (Cry1Ab), Herculex® I (Cry1F), MIR 162 (Vip3Aa), entre outros, estão liberados para o comércio pela CTNBio no Brasil, expressando as proteínas com atividade inseticida provenientes da bactéria *B. thuringiensis*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Condições de cultivo bacteriano

As análises moleculares do presente trabalho foram desenvolvidas na Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal, junto ao Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA) do Departamento de Biologia Aplicada a Agropecuária.

O estoque do isolado 131 de *B. thuringiensis* e das linhagens var. *tolworthi* HD-125 e var. *tenebrionis*, utilizadas neste estudo como controle positivo e negativo respectivamente, é mantido na forma de fitas de papel filtro impregnadas com uma suspensão de esporos em água estéril e mantidas a 4 °C. Uma alíquota da suspensão de esporos foi estriada em placas de Petri, contendo meio de cultura sólido “Brain Heart Infusion Broth” (Himedia) (12,5 g.L⁻¹ de infusão de cérebro, 5 g.L⁻¹ de infusão de coração, 10 g.L⁻¹ de peptona, 2 g.L⁻¹ de glicose, 5 g.L⁻¹ de cloreto de sódio 5 e 2,5 g.L⁻¹ fosfato dissódico de hidrogênio, 15 g.L⁻¹ de ágar 15 g.L⁻¹) e acondicionadas a 30 °C por 16 h. As colônias obtidas foram inoculadas em 2 mL de meio de cultura líquido “Brain Heart Infusion Broth” (Himedia) e multiplicadas por 16 h a 30 °C sob agitação constante a 200 rpm.

4.2 Extração de DNA total

O DNA genômico das linhagens var. *tolworthi* e var. *tenebrionis* e do isolado 131 foram extraídos pelo método de fervura (LETOWSKI et al., 2005). Após período de cultivo, as culturas bacterianas foram transferidas para tubos de microcentrifuga de 2 mL, e centrifugadas a 17.949 xg por 3 min a 20 °C. Os sobrenadantes foram descartados, os precipitados ressuspensos em 400 µL de água deionizada estéril e em seguida agitados vigorosamente em aparelho do tipo vórtex. Posteriormente, as amostras foram incubadas por 15 min em água a 100 °C e resfriadas por 10 min em temperatura ambiente, sendo em seguida

centrifugadas à 17.949 xg por 15 min à 20 °C. Em seguida, 200 µL do sobrenadante foram transferidos para outro tubo de microcentrifuga (Eppendorf modelo 5415C). As amostras de DNA permaneceram armazenadas a -20 °C até a sua utilização.

3.3 Amplificação do gene *vip3A*

Os DNAs genômicos bacterianos foram submetidos à técnica de PCR com oligonucleotídeos iniciadores VIP5 (senso - ATGACCAAGAATAATACTAAATTAAGC) VIP6 (antissenso - GATCTTACTTAATAGAGACTACG) para amplificação do gene *vip3A* completo. Esses iniciadores foram elaborados baseados na sequência do gene *vip3Aa1* (GenBank acesso L48811) conforme descritos por Loguercio et al. (2002), se anelando ao codón de iniciação e de terminação do gene.

A PCR foi realizada em volume total de 25 µL, contendo: 150 ng de DNA, 1 U de enzima “Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity” (Invitrogen), 1 X “High Fidelity PCR Buffer” (Invitrogen), 2 mM MgSO₄, 10 pmoles do iniciador VIP5, 10 pmoles do iniciador VIP6, 0,2 mM de mistura de dNTPs, de água destilada deionizada estéril.

As reações foram realizadas em um termociclador (PTC-100 “Programmable Thermal Controller – MJ Research”, inc. com circuito “Hot Bonnet”) e submetidas a um ciclo com um passo inicial de desnaturação por 2 min a 94 °C, seguidos de 30 ciclos de: 1 min a 94 °C para desnaturação, 1 min a 53 °C para pareamento dos iniciadores e 2 min a 68 °C para extensão e um passo final para completa extensão de 5 min a 68 °C.

Os produtos das reações foram visualizados e analisados em gel de agarose 0,8%, utilizando-se de 10 µL do produto da PCR adicionado de 3 µL de tampão de carregamento (Tris – HCl 0,1 M, pH 6,8; azul de bromofenol a 0,02%; glicerol 50%) e 5 µL 1kb DNA “ladder” (Fermentas), o qual serviu como referência de migração eletroforética e para verificação dos tamanhos dos fragmentos obtidos após a PCR.

O gel, contendo brometo de etídeo (0,5 µg.mL⁻¹) foi submetido à eletroforese horizontal a 70 V por 2 h, conduzida em tampão 1 X TEB (Tris 0,4 M, EDTA 0,1M, Borato 0,01 M, pH 8,3), também adicionado de brometo de

etédeo ($0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) visualizados sob fonte de luz U.V e registrados por meio de um sistema de fotodocumentação digital em equipamento GEL DOC 2000 (BioRad), por meio do programa “Quantity-One”.

3.4 Clonagem do gene *vip3A* em vetor pGEM–T Easy

O gene *vip3A* completo foi clonado no vetor pGEM-T Easy (Promega). Para tanto, foram misturados 2 μL do produto da PCR, 25 ng pGEM-T Easy, 1 X “Rapid Ligation Buffer” (Promega), 3 U T4 DNA ligase (Promega), água destilada deionizada estéril e a reação foi mantidas a 4 °C por 16 h.

3.5 Transformação bacteriana

As alíquotas de células competentes de *Escherichia coli* linhagem DH10B foram retiradas do freezer - 80 °C e descongeladas em gelo. O produto da reação de ligação (vetor + inserto) com volume total de 10 μL foi adicionado à 200 μL de células competentes para a transformação via choque térmico (HANAHAN et al., 1983). Após leve homogeneização, o produto da reação foi mantido em gelo por 30 min. Decorrido o tempo, a reação foi submetida a um choque térmico, o qual foi constituído de 1,5 min a 42 °C seguido de 2 min em gelo.

Feito isso, foram adicionados às células 800 μL de meio de cultura SOC (128,4 μL de KCl 1M, 100 μL de MgCl_2 1M, 100 μL de MgSO_4 1M e 200 μL de glicose 1M) e estas foram mantidas a 37 °C por 1 h a 150 rpm.

Para seleção dos transformantes, uma alíquota de 100 μL das células foi estriada em cada placa de Petri contendo meio de cultura Luria-Bertani (LB) sólido (10 g.L^{-1} triptona, 5 g.L^{-1} extrato de levedura, 10 g.L^{-1} NaCl e 15 g.L^{-1} agar) com ampicilina ($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e 70 μL de solução X-Gal (0,05 g dissolvido em 1 mL de N’N’dimetilformamida) em cada placa. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C por 16 h. Os clones transformantes (colônias brancas) foram selecionados e transferidos para tubos de ensaio contendo meio de cultura LB líquido com ampicilina ($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e as células foram multiplicadas a 37 °C por 16 h sob agitação constante a 220 rpm. Posteriormente, alíquotas de 600 μL foram assepticamente estocadas acrescidas de glicerol estéril (40%) e

armazenadas em ultracongelador a - 80 °C. As alíquotas restantes de cada clone foram utilizadas para a extração do DNA plasmidial.

3.6 Extração do DNA plasmidial

A metodologia utilizada na extração de DNA plasmidial dos clones coletados após a transformação foi a de Lise Alcalina com SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

A suspensão de células, 1,5 mL, foi transferida para tubos de microcentrifuga (Eppendorf modelo 5415C) e centrifugada por 5 min a 17.949 xg e os sobrenadantes foram descartados. Foram adicionados às amostras 200 µL da solução I (25 mM de Tris-HCl pH 8,0, 10 mM de EDTA, 50 mM de D-glicose), previamente resfriada. As mostras foram agitadas em vortex até a completa solubilização das células. As amostras foram mantida a temperatura ambiente por 5 min em seguida, 200 µL da solução II (0,2 N de NaOH, 1% de SDS) foram adicionados.. A amostra foi misturada por meio da inversão dos tubos e os tubos foram mantidos no gelo por 5 min. Decorrido esse período, 150 µL da solução III (3 M de acetato de potássio, 2 M de ácido acético) foram acrescentados. Os tubos foram invertidos algumas vezes e mantidos por 5 min no gelo.

Os tubos foram, em seguida, submetidos à centrifugação a 17.949 xg por 5 min. A fase aquosa (aproximadamente 500 µL) das amostras foram transferidas para novos tubos e 500 µL de fenol/clorofórmio (1:1) foram adicionados a cada novo tubo. Após 2 min de homogeneização em vortex, procedeu-se a centrifugação das amostras por 5 min a 17.949 xg. O DNA foi precipitado por meio da adição de 700 µL de etanol absoluto a cada amostra. As amostras foram homogeneizadas e mantidas em gelo por 5 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas à 17.949 xg por 5 min e o sobrenadante foi descartado.

Ao precipitado foi adicionado 1 mL de etanol 70%, centrifugados à 17.949 xg por 5 min, seco em fluxo laminar e ressuspenso em 50 µL de TE (Tris HCl 10 mM pH 8,0 e EDTA 0,1 M pH 8,0), contendo RNase A (0,01 mg/mL). O DNA foi armazenado a - 20 °C até sua utilização.

O DNA plasmidial foi quantificado em espectrofotômetro, mensurando a absorvância nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm, sendo a relação 260/280 nm calculada segundo Sambrook e Russel, (2001) para se determinar a qualidade e a leitura a 260 nm para se calcular a concentração das amostras de DNA.

A fim de se verificar a presença de plasmídeos recombinantes foram realizadas PCRs com os pares de iniciadores T7 e SP6 (Tabela 1), iniciadores que se anelam ao vetor pGEM T-Easy e com VIP5 e VIP6, par de iniciadores que se anelam ao gene *vip3A*, com o objetivo de se comprovar também, a presença do gene *vip3A* completo nos clones transformantes de *E. coli* DH10B

A PCR foi realizada em volume total de 20 µL, contendo: 3 µL de DNA (50 ng), 0,4 µL de enzima Taq DNA polimerase, 2 µL de tampão de PCR, 0,8 µL MgCl₂ (50mM), 0,5 µL de cada iniciador (10 pmoles), 0,4 µL de mistura de dNTPs (10 mM) e 12,4 µL de água destilada deionizada estéril.

O ciclo de amplificação foi composto de um passo inicial de desnaturação, 2 min a 94 °C, seguidos de 30 ciclos de: 1 min a 94 °C para desnaturação, 1 min a 53 °C para pareamento dos iniciadores e 2 min a 72 °C para extensão e um passo final para completa extensão de 5 min a 72 °C. As amostras foram visualizadas e analisadas como já descrito.

3.7 Sequenciamento do gene *vip3A*

Para a obtenção da sequência completa do gene *vip3A*, foram utilizados iniciadores sintetizados com base em regiões conservadas de genes *vip3A* depositados no banco de dados GenBank e elaborados a partir das sequências obtidas do gene *vip3A* do isolado 131 durante as análises (Tabela 1).

Tabela 1. Iniciadores utilizados no sequenciamento

Iniciador	Sequencia (5' → 3')
¹ VIP5 (d)	ATg ACC AAg AAT AAT ACT AAA TTA AgC
¹ VIP2 (r)	TCT ggg CAC AAT AAT TTA TCC
¹ VIP3 (d)	CAG gAC ATg CAT TgA TTg g
¹ VIP6 (r)	gAT CTT ACT TAA TAg AgA CAT Cg
¹ V1R (r)	gCA ggT gTA ATT TCA gTA AgT gTA gAg
² 61BF (d)	CTC TAT gTT gAg TgA TgT AAT
² 61BR (r)	TCC gAC CTC ACT gCC ACT Tg
² 61CR (r)	TgA TCC CgT ACT CgT CC
² 61DF (d)	Cgg AgA TgC TAA TgT AAg g
³ Primer1F (d)	CCC TAC ACT TTC TAA TAC
³ Primer2R (r)	CCg CTT CAC TTg ATT CTA C
⁴ T7 (d)	TAA TAC gAC TCA CTA TAg gg
⁴ SP6 (r)	ATT TAg gTg ACA CTA TAg

¹ LOUGUERCIO et al., (2002); ²MARUCCI, (2010); ³ Neste trabalho; ⁴ “Kit pGEM-T Easy Vector Systems” (Promega).

Foram realizadas reações de sequenciamento contendo “Big Dye Terminator v 3.1” (Applied Biosystems), empregando-se o analisador automático de DNA modelo 3100 “Genetic Analyzer” ABI (Applied Biosystems).

As reações de sequenciamento foram constituídas de 2,0 µL de H₂O destilada estéril, 4,0 µL de tampão de sequenciamento 2,5X (Tris-HCl 200 mM pH 9,0 e MgCl₂ 5 mM), 1,0 µL de “BigDye 3 Terminator”, 2,0 µL de DNA plasmidial (50 ng) e 1,0 µL do iniciador (10 pmoles) a ser utilizado. O ciclo foi composto pelas seguintes etapas: 96 °C por 2 min, 96 °C por 10 s, 52 °C por 20 s, 60 °C por 4 min, a partir da etapa segunda os passos foram repetidos por 39 vezes e ao término do ciclo as amostras foram mantidas a 4 °C.

Em seguida, 1,0 µL de EDTA (125 mM, pH 8,0); 1,0 µL de Acetato de Sódio (3 mM, pH 5,2); 25,0 µL de etanol absoluto foi adicionado em cada reação. As placas foram incubadas em temperatura ambiente por 15 min e após esse período as amostras foram centrifugadas 4000 rpm, 4 °C por 30 min. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 35,0 µL de etanol 70% a cada amostra. O material foi centrifugado a 4000 rpm, 4 °C por 15 min. O sobrenadante foi descartado novamente e repetida a lavagem do precipitado com 35,0 µL de Etanol 70%. As amostras foram centrifugadas a 4000 rpm, 4 °C por 15 min e secas em fluxo laminar por 40 min.

3.8 Análise dos dados gerados por meio do sequenciamento

As análises de bioinformática foram realizadas utilizando-se a infraestrutura do Laboratório de Bioinformática do CREBIO (Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica) da UNESP Campus de Jaboticabal, em conjunto com a equipe de Bioinformática deste centro.

Os cromatogramas resultantes de todas as fases de sequenciamento de DNA foram submetidos ao "base calling" (atribuição de qualidade para pontuação de cada base lida), a montagem do fragmento por meio do alinhamento das sequências e visualização gráfica da montagem resultante, utilizando-se a ferramenta Phred/Phrap/Consed (EWING; GREEN, 1998; EWING et al. 1998; GORDON; ABAJIAN; GREEN, 1998), em um computador tipo servidor Dell PowerEdge 2900 e em ambiente operacional Linux RedHat Enterprise 4.0.

Para que a sequência consenso fosse gerada, foi definido que todas as bases deveriam ter no mínimo qualidade phred ≥ 40 , o que corresponde a uma precisão igual ou menor do que 1 erro a cada 10.000 pb (acurácia de 99,99%). A sequência FASTA resultantes foi comparada com os bancos de dados públicos não redundantes de proteínas da ferramenta BLAST (ALTSCHUL et al. 1990) através do algoritmo BLASTX, disponível publicamente na página NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

3.9 Clonagem do gene *vip3A* em vetor pET-28a (+)

Para expressão heteróloga, o gene *vip3A* foi sub-clonado no vetor de expressão pET-28a (+) (Novagen) a partir do vetor pGEM-T Easy.

O vetor de expressão foi clivado com a enzima *NotI* (Fermentas). A reação foi composta de 10 μ g de DNA plasmidial, 1 X tampão *NotI* (Fermentas), 10 U de enzima *Not I* e de água destilada deionizada estéril. A reação foi mantida a 37 °C por 3 h. Após esse período, a temperatura foi elevada a 65 °C e a reação incubada por 20 min para a inativação da enzima. O vetor pET-28a (+) clivado foi submetido à reação de desfosforilação composta de tampão para fosfatase alcalina 1X, 10U da enzima fosfatase alcalina (Fermentas). Em seguida, o produto da reação de desfosforilação foi

purificado com os reagentes do “kit QIAquick® PCR purification” (QIAGEN) e visualizado em gel de agarose 0,8%.

O DNA plasmidial do clone 20 utilizado no sequenciamento do gene *vip3A* foi clivado como descrito para o vetor pET-28a (+), a fim de se liberar do vetor pGEM T –Easy o gene *vip3A* clonado. O produto da reação foi visualizado em gel de agarose 0,8%. O fragmento referente ao inserto (gene *vip3A*), foi excisado do gel e purificado com o “kit PureLink Quick Gel Extraction” (Invitrogen).

A reação de ligação foi realizada em um volume total de 20 µL, contendo: 120 ng do DNA inserto, 60 ng do DNA do vetor pET-28a (+), 1 X “Rapid Ligation Buffer” (Promega), 3 U da enzima T4 Ligase (Promega) e água destilada deionizada estéril, sendo esta mantida a 4 °C por 16 h.

O produto da reação de ligação foi utilizado para transformar, por choque térmico, células de *E. coli* DH10B competentes (HANAHAN et al., 1983). Para seleção dos transformantes, alíquotas de 100 µL das células foram estriadas em placas de Petri contendo meio de cultura LB sólido suplementado com canamicina (50 µg.mL⁻¹). As placas foram incubadas em estufa a 37 °C por 16 h. Os clones transformantes foram selecionados e transferidos para tubos de ensaio contendo 3 mL de meio de cultura LB líquido suplementado com canamicina (50 µg.mL⁻¹) e as células foram multiplicadas a 37 °C por 16 h sob agitação constante a 220 rpm.

O DNA plasmidial dos clones foi extraído como descrito na seção 4.6, quantificado, diluído à concentração de 50 ng.µL⁻¹ e utilizado na PCR com os oligonucleotídeos “T7 Promoter” (5’ TTA TAC GAC TCA CTA TAG GG 3’) e “T7 Terminator” (5’ GCT AGG TTA TTG CTC AGC GG 3’), seguindo as condições já descritas.

A seleção do clone contendo o inserto sub-clonado na orientação correta foi realizada por sequenciamento. As reações foram realizadas com o iniciador “T7promoter”, seguindo as mesmas condições descritas no item 3.6 (Sequenciamento do gene *vip3A*). Foram considerados positivos os clones cujo sequenciamento evidenciou após a região “T7 promoter” do vetor, a região inicial do gene, ou seja, seu códon de iniciação.

O DNA plasmidial de um clone foi transformado como já descrito em células *E. coli* BL21 (DE3). Para seleção dos transformantes, uma alíquota de

100 μL das células foram estriadas em placas de Petri contendo meio de cultura LB sólido com canamicina ($50 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$). As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 16 h. Os clones transformantes foram selecionados e transferidos para tubos de ensaio contendo 3 mL de meio de cultura LB líquido com canamicina ($50 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$) e as células foram multiplicadas a 37°C por 16 h sob agitação constante a 220 rpm.

O DNA plasmidial dos clones foi extraído, quantificado, diluído à concentração de $50 \text{ ng}.\mu\text{L}^{-1}$, utilizado na PCR com os iniciadores VIP5 e VIP6 e o produto visualizado em gel de agarose como descrito anteriormente. Os clones positivos foram assepticamente estocados em glicerol estéril (40%) e armazenados em ultracongelador a -80°C .

4.10 Expressão da proteína *vip3A* em *E. coli* BL21 (DE3)

Os clones transformantes em células de *E. coli* BL21 (DE3) foram cultivados em meio LB sólido com canamicina ($50 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$). Uma colônia isolada foi coletada e inoculada em 3 mL de meio LB líquido suplementado com canamicina ($50 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$) multiplicada a 37°C por 16 h sob agitação constante a 250 rpm. Um volume de 1,5 mL desta pré-cultura foram transferidos para cada inóculo de 250 mL de meio LB líquido suplementado com canamicina ($50 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$). Os inóculos foram submetidos à agitação a 250 rpm, a 37°C até atingir $D.O_{600}$ 0,6. A expressão da proteína Vip3 foi induzida pela adição 0,5 mM IPTG. As culturas foram mantidas a 200 rpm, 22°C por 16 h.

Decorrido o tempo de indução, as células foram coletadas por centrifugação a $17.400 \times g$ por 20 min. Os “pellets” foram ressuspensos em tampão fosfato 20 mM ($0,02 \text{ M NaH}_2\text{PO}_4.\text{H}_2\text{O}$; $0,02 \text{ M Na}_2\text{HPO}_4.\text{H}_2\text{O}$; $0,5 \text{ M NaCl}$; pH 7,4), 150 μL lisozima ($100 \text{ mg}.\text{mL}^{-1}$), 50 μL DNAse ($1 \text{ mg}.\text{mL}^{-1}$), 5 μL PMFS ($0,1 \text{ M}$) incubando-se por 30 min, com agitação de 100 rpm a 37°C . Em seguida, as amostras foram submetidos à sonicação por 2 vezes de 60 s, com 10 s de pausa, com “power” em 60%. As amostras foram centrifugadas por 30 min, a $17.400 \times g$ a 4°C . Os sobrenadantes foram transferidos para tubos Falcon de 15 mL estéreis e armazenados a -20°C até a sua utilização.

A verificação da expressão proteica foi realizada por meio de resolução em gel SDS-PAGE, sendo o de separação a 12% e o de empilhamento a 5%

de conforme Laemmli (1970). Foram adicionados 10 μ L de tampão de amostra [Tris-HCl 0,187M, pH 7,0 SDS 2,0% (m/v), azul de bromofenol 1,0% (m/v), glicerol 27% (v/v)] e β -mercaptoetanol 5,0% (v/v) as alíquotas de 20 μ L do lisado bacteriano da cultura induzida e não induzida e submetidas por a 100°C por 2 min. Em seguida, as amostras e 10 μ L do marcador “Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder” (Fermentas) foram aplicadas no gel. A eletroforese foi realizada em tampão Tris-Glicina (50mM Tris, pH 8,6, 1,92 M glicina e 1% SDS), a 30 mA e 300V por 80 min, utilizando o equipamento eletroforese vertical “Mini Protean II” (Bio-Rad). O gel foi corado com “Coomassie-Brilliant Blue” R-250 0,1% (m/v), dissolvido em 50% de metanol e 10% de ácido acético sob agitação por 20 min. A descoloração do gel foi realizada com solução descolorante (10% de metanol e 10% de ácido acético) sob agitação por 3 h.

A concentração das proteínas totais presentes no lisado da cultura induzida foi determinada por Bradford (1976) e a concentração da proteína induzida, Vip3A, foi determinada por densitometria após a separação SDS-PAGE a 12% com o programa “Bionumerics” (Applied-Maths) utilizando a soroalbumina bovina (BSA) como padrão para construção da reta.

3.11 Detecção da proteína Vip3A por “Western blotting”

Para a realização do “Western blotting” segundo Towbin et al. (1979), um gel como descrito foi preparado e não corado. O conteúdo deste foi transferido para uma membrana “Amersham Hybond-P PVDF” (GE Healthcare) com auxílio do equipamento Trans - blot SD (Bio-Rad), segundo instruções do fabricante da cuba de eletroforese e submetido à 100 V, 350 mA por 1 h.

A membrana foi colocada em uma solução bloqueadora de 10 mL de tampão PBS-T (NaCl 8 g.L⁻¹; KCl 0,2 g.L⁻¹; Na₂HPO₄ 1,44 g.L⁻¹; KH₂HPO₄ 0,24 g.L⁻¹ e Tween-20 0,1% v.v⁻¹) adicionado de leite em pó desnatado 5% m.v⁻¹ sob agitação por 1 h. A membrana foi enxaguada duas vezes com PBS-T e colocada em solução com anticorpo anti-histidina (Sigma) : PBS-T (1 : 5000). A membrana foi incubada nesta solução sob agitação por 1 h. Depois lavada com uma solução de PBS-T. Posteriormente foi colocada em solução com anticorpo anti-IgG conjugado com peroxidase (GE) : PBS-T (1 : 5000). A membrana foi

incubada nesta solução sob agitação por 1 h. Depois transferida lavada com uma solução de PBS-T.

A revelação foi realizada com “SIGMAFAST™ DAB With Metal Enhancer Tablet Set” (Sigma-Aldrich), na forma de drágeas dissolvidas em 15 mL de água deionizada, sob agitação até a visualização das bandas na membrana. A membrana foi lavada em água deionizada para interrupção da reação, seca em temperatura ambiente e, ao final, guardada ao abrigo da luz.

3.12 Bioensaios com *Spodoptera frugiperda* e *Anticarsia gemmatalis*

Nos bioensaios, foram utilizadas lagartas recém-eclodidas (neonatas) provenientes da criação massal mantida pela empresa Gravena LTDA. Os bioensaios foram mantidos sob condições climáticas controladas: temperatura $25 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa do ar 70%, $\pm 10\%$ e luminosidade 14 h de luz: 10 h de escuro.

As diferentes concentrações da pró-toxina Vip3A, diluída em solução de tampão fosfato 20 mM em um volume de 50 μL , foram aplicadas sobre dieta artificial (PRAÇA et al., 2004) em placas de poliestireno de 128 poços (Bio-Assay Tray – Bio-Serv). Para determinação da concentração letal para 50% e 90% das lagartas (CL_{50} e CL_{90}), foram utilizadas as concentrações 0, 5; 15; 30; 50; 150; 500; 1500 $\text{ng}\cdot\text{cm}^{-2}$ para *S. frugiperda* e 0; 12; 25; 50; 100 ; 200 e 1000 $\text{ng}\cdot\text{cm}^{-2}$ para *A. gemmatalis* decididas em ensaios preliminares.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em quaduplicata, com 16 lagartas por repetição. A mortalidade foi avaliada no sétimo dia após a exposição das lagartas à dieta com proteína inseticida vegetativa. A CL_{50} e a CL_{90} foram calculadas por meio da análise *probit* utilizando o programa de estatística POLO-PC (LeOra Software,. Berkeley, CA).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os genes *vip* de *B. thuringiensis* têm sido buscados em coleções, isolados, sequenciados, clonados e expressos em *E. coli*, outros microrganismos e plantas para estudos de função e atividade inseticida, devido ao grande potencial desta classe de proteínas inseticidas no controle de pragas agrícolas de interesse econômico (ABDELKEFI-MERASTI et al., 2011).

A amplificação do gene *vip3A* do isolado 131 de *B. thuringiensis* com os iniciadores específicos permitiu a clonagem do gene completo no vetor pGEM-T Easy, partindo do códon de iniciação (ATG) até o códon de terminação (TAA) (Figura 1). Este vetor possui extremidades 5' com um nucleotídeo timina e a enzima utilizada na amplificação, segundo o fabricante, adiciona o nucleotídeo adenina à extremidade 3' do produto amplificado. Assim, as extremidades sobressalentes do vetor e do inserto foram facilmente unidas por meio de uma reação de ligação em função de sua complementaridade.

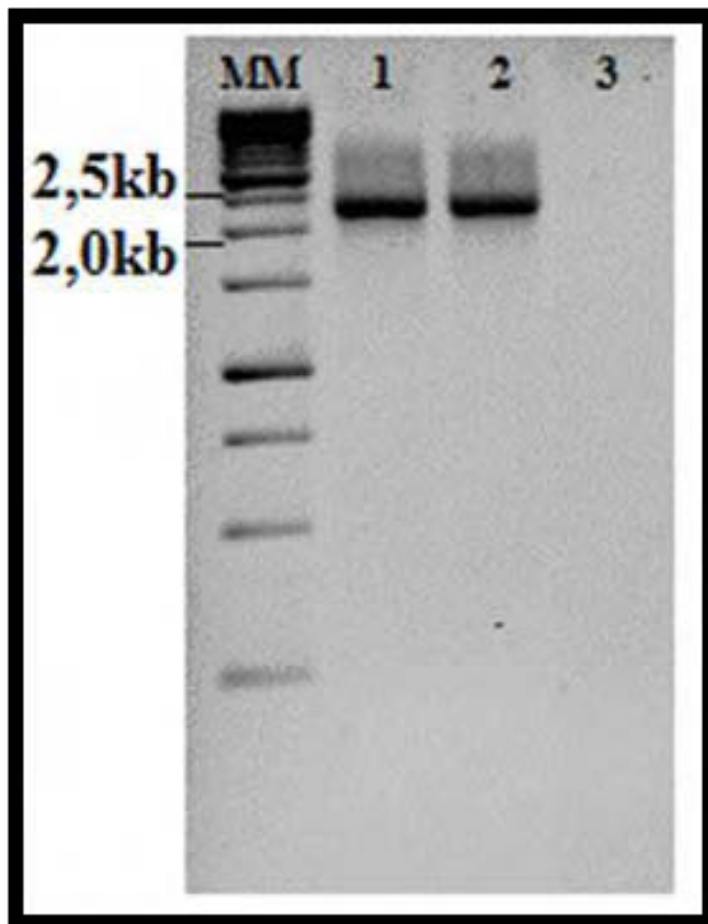


Figura 1. Eletroforograma evidenciando fragmento com aproximadamente 2370 pb correspondente ao gene *vip3A* amplificado por PCR, utilizando o par de oligonucleotídeos iniciadores VIP5-VIP6 em gel de agarose 0,8%. MM: marcador de massa molecular 1kb DNA “ladder” (Fermentas); 1: Isolado 131; 2: *B. thuringiensis* var. *tolworthi* HD-125 (controle positivo) e 3: *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* (controle negativo).

As colônias portadoras do inserto de interesse foram selecionadas com base no sistema de *lacZ*. As colônias com coloração branca, após cultivo em meio induzido com IPTG, e em presença de X-Gal, foram coletadas, por serem possíveis portadoras do gene *vip3A*.

A seleção de clones contendo o gene *vip3A*, para o posterior sequenciamento foi realizada com sucesso, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores T7 e SP6 que flanqueiam o sítio de clonagem no vetor pGEM T-Easy e os iniciadores VIP5 e VIP6 que foram utilizados para amplificação do referido gene (Figura 2 e 3). Os clones 5, 19 e 20 foram selecionados para o sequenciamento por apresentarem o tamanho de fragmento para amplificação

com os iniciadores T7-SP6 e VIP5-VIP6, indicando a clonagem do gene completo.

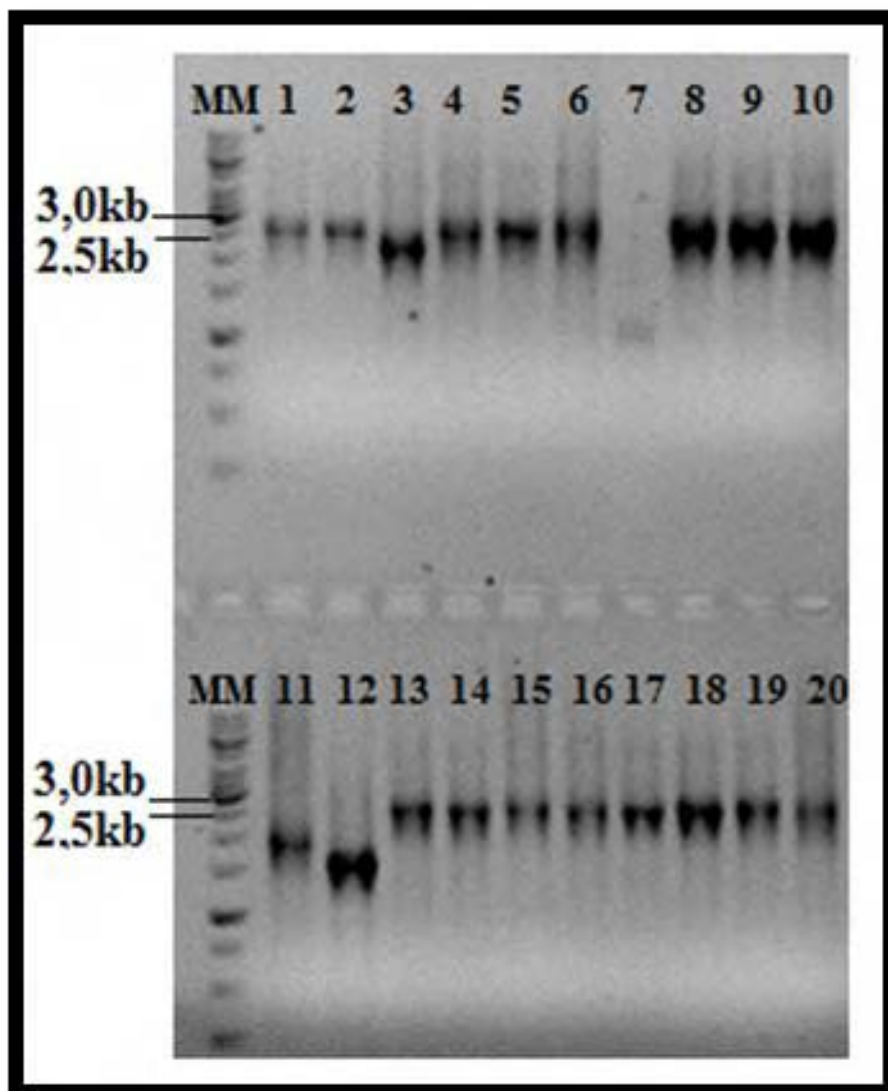


Figura 2. Eletroforograma evidenciando fragmento com aproximadamente 2600 pb correspondente a amplificação da região de clonagem do vetor pGEM T-Easy e gene *vip3A* clonado, utilizando-se o par de oligonucleotídeos iniciadores T7-SP6 em gel de agarose 0,8%. MM: marcador de massa molecular 1kb DNA “ladder” (Fermentas); 1-20: clones selecionados de *E. coli* DH 10B.

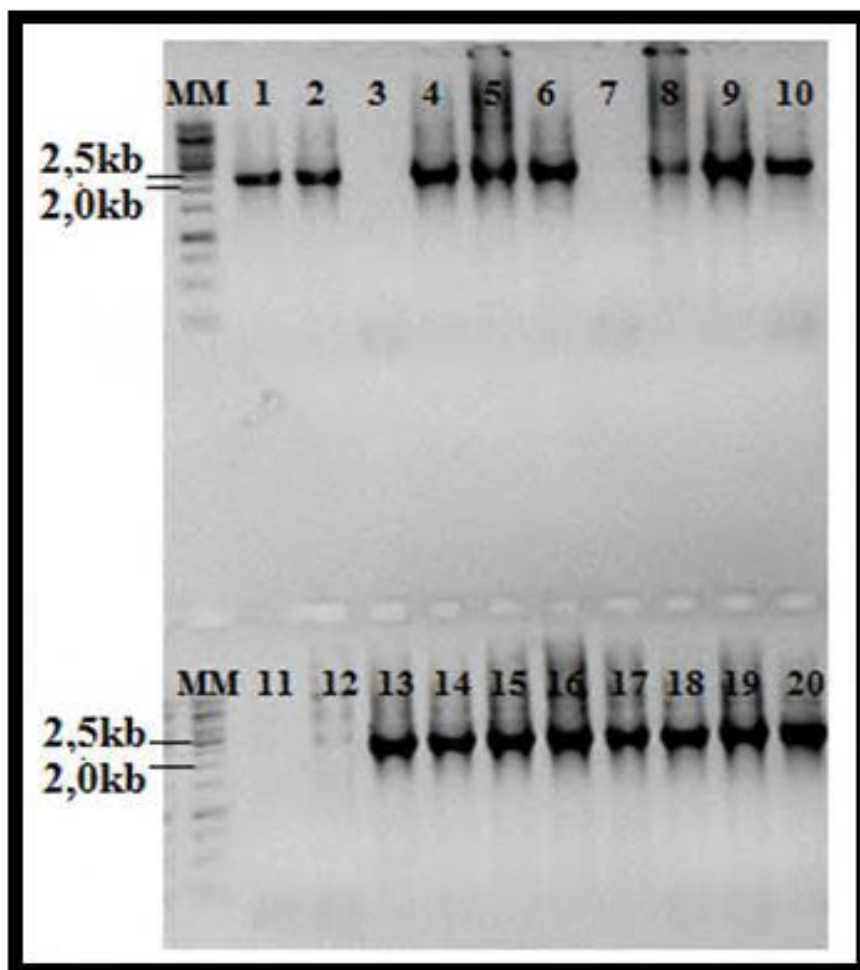


Figura 3. Eletroforograma evidenciando fragmento com aproximadamente 2370 pb correspondente a amplificação do gene *vip3A* clonado no vetor pGEM T-Easy, utilizando-se o par de iniciadores VIP5-VIP6 em gel de agarose 0,8%. MM: marcador de massa molecular 1kb DNA “ladder” (Fermentas); 1-20: clones selecionados de *E. coli* DH 10B.

Os iniciadores utilizados nas reações de sequenciamento cobriram de maneira satisfatória a extensão do gene permitindo a obtenção de uma sequência Fasta com elevada qualidade. Em todo o processo, foram sequenciados 192 “reads”, dentre os quais 150 foram considerados com qualidade suficiente para serem incluídos na montagem do gene *vip3* pelo programa Phred/Phrap/Consed. Como resultado, obteve-se um “contig” (uma região contígua de alinhamento) contendo 145 “reads” e 2376 pares de bases. Nesta fase, o gene foi montado completamente, com todas as bases com qualidade estatística (QV) de valor superior a 40, ou seja, segundo à fórmula $QV = -10 \log_{10}$ a probabilidade de erro das bases utilizadas foi inferior a 0,010%.

A sequência de nucleotídeos, contendo 2370 pb, codificando 789 aminoácidos, foi submetida ao banco de dados GenBank, recebendo o número

de acesso JQ946639. Após o depósito concluído, a sequência foi enviada ao banco de dados "*Bacillus thuringiensis*: Toxin Nomenclature" (http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/) para análise e classificação recebendo a denominação de gene *vip3Aa50*.

Por meio da comparação do gene *vip3Aa50* com sequências depositadas nos bancos de dados públicos não redundantes de proteínas, usando algoritmo BLASTX, foi possível verificar que o gene *vip3Aa50* apresenta uma sequência de aminoácidos com 99% de similaridade com outras proteínas já depositadas (Figura 4). As substituições de aminoácidos evidenciam a presença de um novo alelo da classe Vip3Aa em função das mutações pontuais observadas na sequência (CRICKMORE et al., 1998).

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

Alignments Download GenPept Graphics

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession
<input type="checkbox"/> vegetative insecticidal protein Vip3V [Bacillus thuringiensis serovar chinensis CT-43] >gb AAN60738.1 AF373030.1 vegetative insecti	1531	1531	99%	0.0	99%	YP_005569705.1
<input type="checkbox"/> vegetative insecticidal protein [Bacillus thuringiensis]	1531	1531	99%	0.0	99%	AAW65132.1
<input type="checkbox"/> vip3A(a) [Bacillus thuringiensis] >gb AAQ23140.2 VIP3A [synthetic construct] >gb ABG20428.1 Vip3Aa [synthetic construct] >gb AFK7	1531	1531	99%	0.0	99%	AAC37036.1
<input type="checkbox"/> Vip3A [Bacillus thuringiensis] >gb AAQ32350.1 Vip184 [Bacillus thuringiensis]	1530	1530	99%	0.0	99%	AAL69542.1
<input type="checkbox"/> vegetative insecticidal protein [Bacillus thuringiensis]	1529	1529	99%	0.0	99%	AAW62286.1
<input type="checkbox"/> vegetative insecticidal protein Vip3Aa45 [Bacillus thuringiensis]	1529	1529	99%	0.0	99%	AEE98385.1
<input type="checkbox"/> vegetative insecticidal protein [Bacillus thuringiensis]	1529	1529	99%	0.0	99%	AAX49395.1
<input type="checkbox"/> vegetative insecticidal protein [Bacillus thuringiensis]	1529	1529	99%	0.0	99%	CAA76665.1
<input type="checkbox"/> MIR162 Vip3Aa [synthetic construct]	1528	1528	99%	0.0	99%	ABG20429.1
<input type="checkbox"/> vegetative insecticidal protein [Bacillus thuringiensis]	1528	1528	99%	0.0	99%	CAI96522.1

Figura 4. Alinhamento da sequência do gene *vip3Aa50* obtida a partir do isolado I131 de *B. thuringiensis* realizado dia 30 de janeiro de 2013, utilizando o algoritmo BlastX da ferramenta Blast, disponível publicamente na página do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

A sequência de aminoácidos da proteína Vip3Aa50 (AAC37036) apresenta 99% de similaridade com a proteína Vip3Aa1. Estas substituições levaram, respectivamente, à troca dos aminoácidos: treonina por asparagina (posição 2), aspartato por asparagina (posição 80), lisina por cisteína (posição 284).

Foi possível observar que a sequência de aminoácidos da proteína Vip3Aa50 apresenta 99% de similaridade com 10 sequências depositadas no banco de dados GenBank e no ao banco de dados "*Bacillus thuringiensis*: Toxin Nomenclature" com seguintes números de acesso : Vip3Aa7 (AAK95326.1), Vip3Aa10 (AAN60738.1), Vip3Aa11 (AAR36859.1), Vip3Aa12

(AF500478.2), Vip3Aa15 (AAP51131.1), Vip3Aa21 (ABD84410.1), Vip3Aa33 (ACY38212.1), Vip3Aa34 (ACY38213.1), Vip3Aa36 (ADF43020.1) e Vip3Aa37 (ADJ18213.1). Estas substituições levaram, respectivamente, à troca dos aminoácidos: treonina por asparagina (posição 2), aspartato por asparagina (posição 80).

A proteína Vip3Aa50 apresenta 98% de similaridade com a proteína Vip3Aa14 (AAQ12340), cujo gene foi sequenciado a partir de uma linhagem de *B. thuringiensis* var. *tolworthi*. Estas substituições levaram, respectivamente, à troca dos aminoácidos: treonina por asparagina (posição 2), aspartato por asparagina (posição 80), glutamato por glicina (posição 214), treonina por prolina (posição 220), fenilalanina por serina (posição 274), alanina por leucina (posição 280), leucina por prolina (posição 323), isoleucina por valina (posição 358), cisteína por glicina (posição 401), glutamato por glicina (posição 406), cisteína por prolina (posição 407), treonina por prolina (posição 411), serina por lisina (posição 536), asparagina por treonina (posição 633), metionina por isoleucina (posição 755), fenilalanina por leucina (posição 760), glutamato por glicina (posição 761), tirosina por asparagina (posição 776), histidina por lisina (posição 782).

A alteração de aminoácidos pode causar efeito significativo sobre a atividade inseticida das toxinas como observado por Shen et al., (2009). No trabalho, relataram que poucas substituições de aminoácidos entre as proteínas Vip3Aa26 e Vip3Aa27 acarretaram em atividade inseticida da proteína Vip3Aa27 as espécies *Trichoplusia ni*, *S. exigua* e *H. armigera* e para Vip3Aa26 somente a *T. ni*, ou seja, proteínas de mesma subclasse, porém com espectro de ação diferente. As substituições de aminoácidos Vip3Aa26 (EU294496.1) em relação a Vip3Aa27 (EU332167), respectivamente, são as seguintes: arginina por lisina (posição 91), ácido aspártico por glicina (posição 223), asparagina por ácido aspártico (posição 342), lisina por ácido glutâmico (posição 398), ácido glutâmico por glicina (posição 491), prolina por leucina (posição 514), arginina por histidina (posição 608), alanina por treonina (posição 640), fenilalanina por leucina (posição 662), fenilalanina por leucina (posição 716), treonina por isoleucina (posição 767).

A região N-terminal das proteínas Vip3 é altamente conservada assim, as diferenças entre as sequências de aminoácidos observadas nas proteínas desta família encontram-se principalmente acumuladas na região C-terminal. A

seleção positiva pode ser visualizada a partir do sitio 705 até o sitio 809 em uma região de “loop” da proteína segundo análise computacional da estrutura. A conformação da proteína pode ser importante para sua união aos receptores no inseto. A diversidade vista dentro da família das proteínas Vip pode ter se ocasionado em função das pressões positivas relacionadas à ampliação do espectro de inseto alvos (WU et al., 2007).

Selvapandiyan et al. (2001) realizaram a deleção de códons na região N-terminal e na região C-terminal do gene *vip3Aa9* em ensaios isolados. A expressão heteróloga das proteínas pós-modificações, por *E. coli*, permitiu constatar a ocorrência na alteração da atividade inseticida da proteína. Sendo que a deleção de aminoácidos na região N-terminal não afetou toxicidade contra as larvas de *Chilo partellus*, mas reduziu a toxicidade frente a *Spodoptera litura*. Já a deleção de aminoácidos da região C-terminal reduziu a toxicidade da proteína a *C. partellus* e extinguiu a toxicidade da proteína *S. litura*. Estes resultados indicam uma resposta individual de cada espécie a ação de uma dada toxina em função de sua composição de aminoácidos.

Há assim, a necessidade de se analisar a sequência de aminoácidos de cada proteína e testa-las frente a diferentes insetos, a fim de se encontrar a melhor opção de controle para cada inseto praga. Neste sentido, para a expressão do gene *vip3Aa50* foi escolhido o vetor pET-28a (+) (Novagen). Este vetor possui origem de replicação para *E. coli*, marcador de seleção para resistência à canamicina, região de clonagem com sítios para múltiplas enzimas de restrição, promotor T7 induzível por IPTG (Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo) e uma sequência de hexa-histidina no N-terminal. A expressão da hexa-histidina fusionada a região N-terminal da proteína recombinante permite sua detecção por “Western blotting” e purificação em coluna de afinidade.

O gene completo e já sequenciado foi sub-clonado com sucesso a partir do vetor pGEM-T Easy no vetor de expressão pET-28 (+), utilizando para isso o sitio de reconhecimento presentes ambos os vetores da enzima de restrição *NotI* (Figura 5).

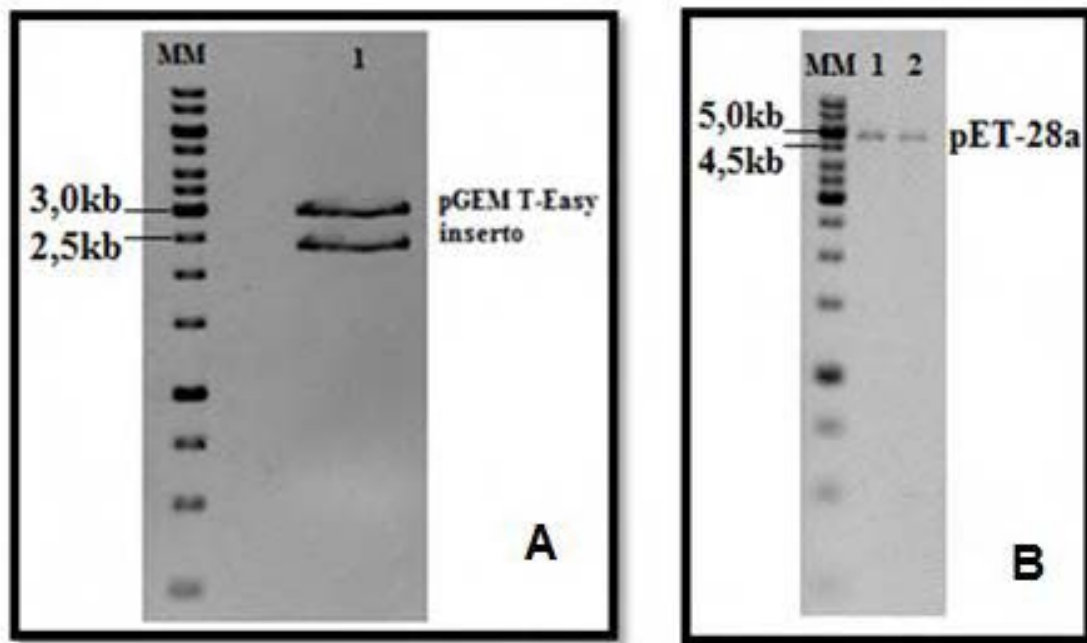


Figura 5. Eletroforograma da reação de restrição utilizando a enzima *NotI* em gel de agarose 1,5%. MM: marcador de massa molecular 1kb DNA “ladder” (Fermentas); (A) DNA plasmidial do clone C-20, contendo o gene *vip3Aa50* (2,37 Kb) proveniente do isolado 131 clonado no vetor pGEM T-Easy (3 Kb); pET-28 (+) (5,3Kb).

Pode se identificar os clones 1, 3, 7 e 17, contendo o gene *vip3Aa50* inseridos no vetor pET-28a (+) por meio de PCR com os iniciadores “T7 promoter” e “T7 terminator” (Figura 6). As sequências destes iniciadores flanqueiam os sítios de clonagem de no vetor pET-28a (+), permitindo assim, verificar a presença ou ausência do inserto, por meio do tamanho do fragmento amplificado.

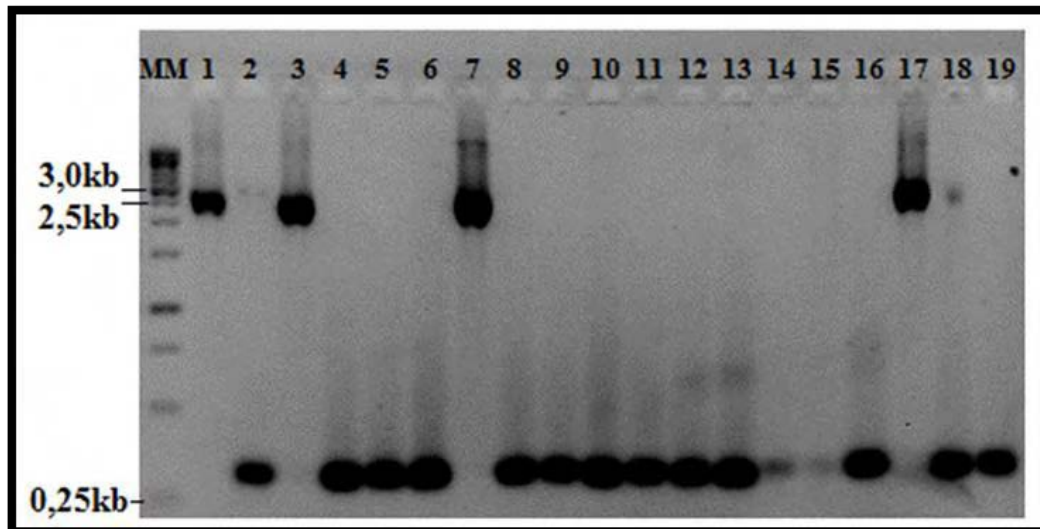


Figura 6. Eletroforograma evidenciando fragmento com aproximadamente 2600 pb correspondente a amplificação da região de clonagem do vetor pET-28a (+) com o gene *vip3A* clonado e 250 pb pET-28a (+) recircularizado, utilizando-se o par de oligonucleotídeos iniciadores T7 promoter-T7 terminator em gel de agarose 0,8%. MM: marcador de massa molecular 1kb DNA “ladder” (Fermentas); 1-19: clones selecionados de *E. coli* DH 10B.

Após a seleção de quatro clones, optou-se por confirmar se vetor e inserto estavam na mesma fase de leitura por sequenciamento. A partir do sequenciamento do DNA plasmidial dos clones selecionados com iniciador “T7 promoter”, foi possível verificar que o clone 1 apresentava o inserto na posição correta, evidenciando o códon de iniciação ATG “in frame” ao promotor presente no vetor de expressão pET-28a (+) (Figura 7). O DNA plasmidial deste clone foi utilizado na transformação de células competentes de *E. coli* BL21 (DE3) (Figura8).

Clone1>

ANTCCNTTTGTTTAANNNTTAAGAAGGAGATATACCCNGGGCAGCAGCCATCATC
ATCATCATCACAGNGGCGGCTGGTGCCGCGCGGCANCCCTATGGCTAGCATG
ACTGGTGGACAGCAAATGGGTCGCGGATCCGAATTCGAGCTCCGTCACAAGC
TTGCGGCCGCGGGAATTCGATTATGACCAAGAATAATACTAAATTAAGCACAA
 GAGCCTTACCAAGTTTTATTGATTATTTTAATGGCATTATGGATTTGCCACTGGT
 ATCAAAGACATTATGAACATGATTTTTAAAACGGATACAGGTGGTGTATCAACCCT
 AGACGAAATTTAAAGAATCAGCAGTTACTAAATGATATTTCTGGTAAATTGGAT
 GGGGTGAATGGAAGCTTAAATGATCTTATCGCACAGGGAGACTTAAATACAGAA
 TTATCTAAGGAAATATTAATAAATTGCAAATGAACAAAATCAAGTTTTAAATGATGTT
 AATAACAACTCGATGCGATAAATACGATGCTTCGGGTATATCTACCTAAAATT
 ACCTCTATGTTGAGTGATGTAATGAAACAAAATTATGCGCTAAGTCTGCCAATAG
 AATACTTTAAGTAANCAATTGCNAGAGATTTCNTGATAAGTTGGATATTATTAATG
 TAAATGTACTTATTAACCTCTACACTTACTGAAATTACNCCCTGCGTNTCANAGG
 ATTAATATGTGANCGAAAAATTTGAGGNATTNACTTTGCTCNGGAACCNGTTCAA
 ANGTAAAAGGATGGCTCCCCNGCANATATCCTTGANGNGTTAACNNGNNTTAA
 CTGANCTNNCNA

Figura 7. Sequência parcial de nucleotídeos do gene *vip3Aa50* clonado no vetor pET-28a (+) do clone 1 de *E. coli* DH10B. Em vermelho, está a sequência do vetor pET-28a (+), sendo a hexa-histidina grifada. Em amarelo, está destacada a sequência inicial do gene *vip3Aa50*, sendo grifado o códon de início, ATG, do gene *vip3Aa* (metionina inicial).

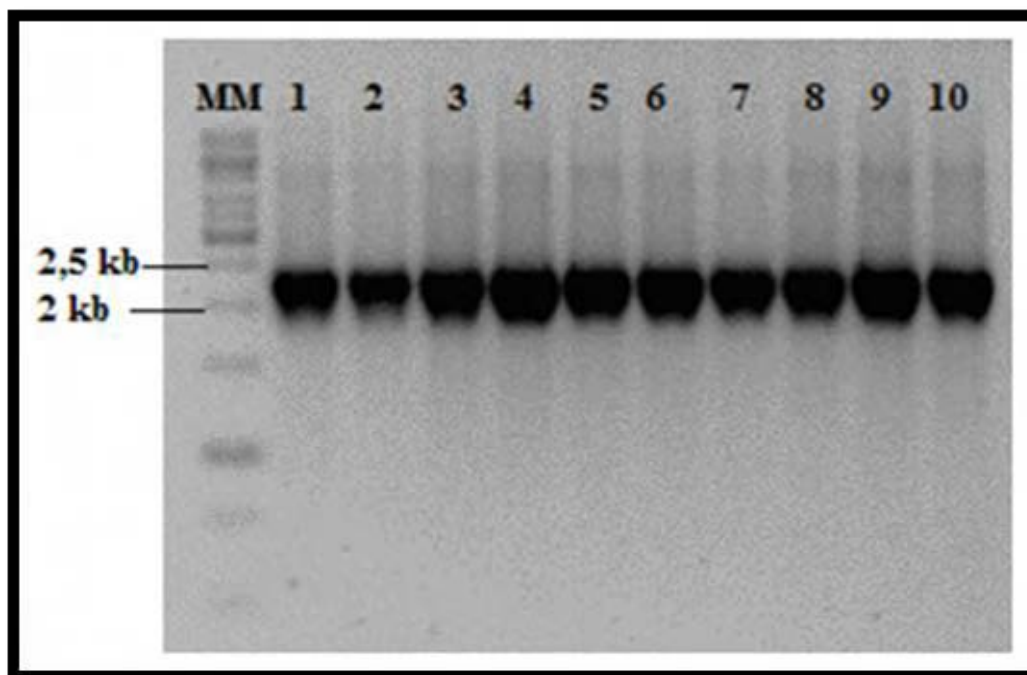


Figura 8. Eletroforograma evidenciando fragmento com aproximadamente 2370 pb correspondente a amplificação do gene *vip3A* clonado no vetor pET-28a (+), utilizando-se o par de oligonucleotídeos iniciadores VIP5-VIP6 em gel de agarose 0,8%. MM: marcador de massa molecular 1kb DNA ladder (Fermentas); 1 á 10: clones selecionados de *E. coli* BL 21 (DE3).

A análise pela técnica SDS-PAGE evidenciou a presença de uma banda com peso molecular de aproximadamente 88,5 kDa na cultura induzida, assim como era esperado para proteína Vip3Aa50 e como foi descrito por Estruch et al. (1996) (Figura 9). Foi possível confirmar a expressão da proteína Vip3Aa50 por “Western blotting” (Figura 10). O reconhecimento da hexa-histidina ligada ao N-terminal da proteína Vip3Aa50 propiciou reação com o anticorpo anti-histidina, evidenciando a expressão em ambas as culturas, sendo mais pronunciada na cultura induzida e basal na não induzida.

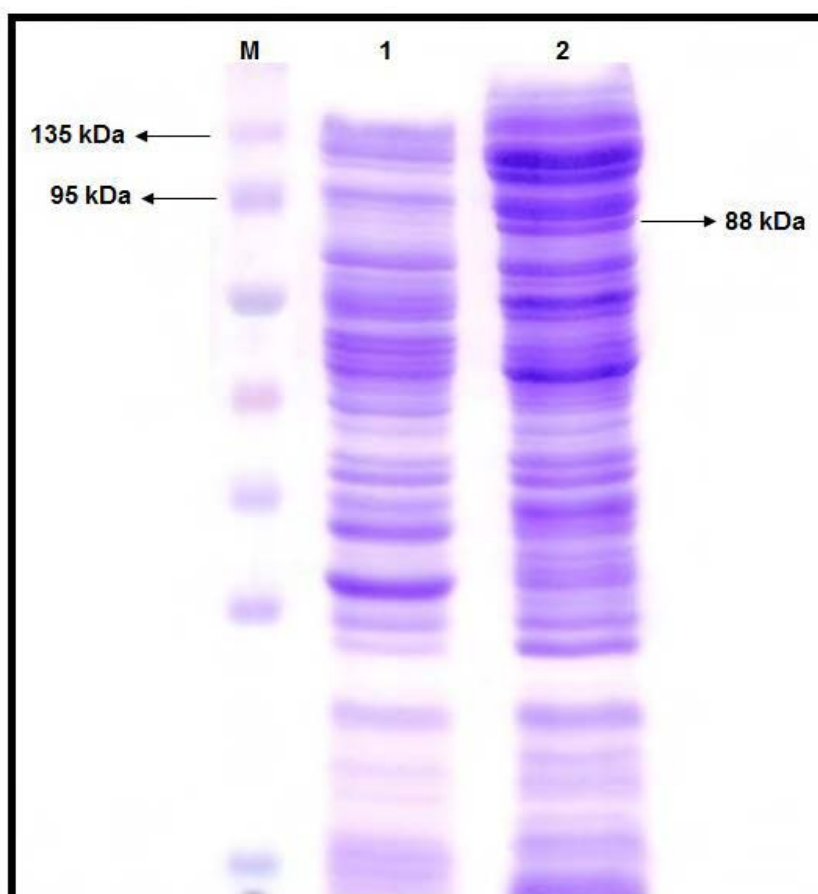


Figura 9. Gel de SDS-PAGE do lisado bacteriano da *E. coli* portadora do vetor pET-28a (+) contendo o gene *vip3Aa50* M: marcador de massa molecular (kDa) “Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder” (Fermentas). 1. lisado de *E. coli* obtido da cultura não induzida. 2. lisado de *E. coli* obtido da cultura induzida, contendo uma proteína de aproximadamente 88 kDa.

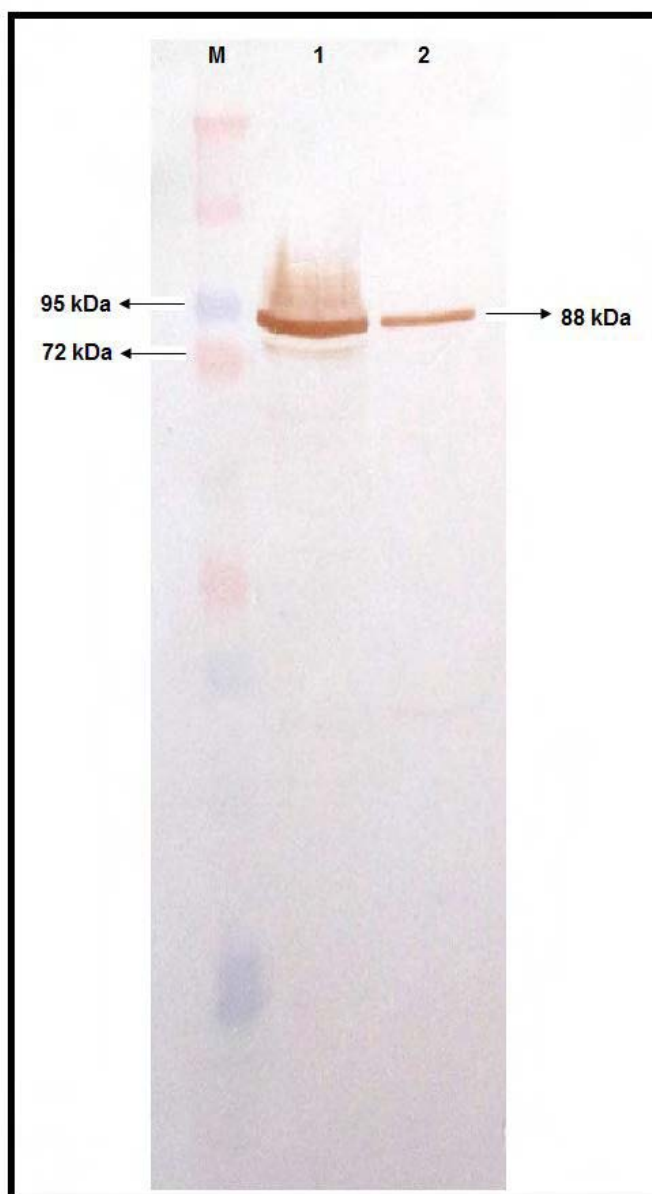


Figura 10. “Western blotting” do lisado bacteriano da *E. coli* portadora do vetor pET-28a (+) contendo o gene *vip3Aa50* M: marcador de massa molecular (kDa) “Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder” (Fermentas). 1. Lisado de *E. coli* obtido da cultura induzida. 2. Lisado de *E. coli* obtido da cultura não induzida, presença em 1 e 2 a reação da proteína de aproximadamente 88 kDa com o anticorpo anti-histidina.

Os valores da CL_{50} e CL_{90} para a pró-toxina Vip3Aa50 contra as lagartas neonatas de *S. frugiperda* e *A. gemmatalis* foram estimados por análise *probit* (Tabela 2). A aplicação da pró-toxina sobre a dieta artificial tem se mostrado eficiente na realização de ensaios de toxicidade contra lepidópteros praga. Esta metodologia tem apresentado a vantagem de consumo de menor quantidade

de proteína no processo se comparada à incorporação da toxina a dieta, sendo o efeito de ambas similares (ALI e LUTTRELL, 2011).

A pró-toxina Vip3Aa50 apresentou alta toxicidade a ambas as espécies de lagartas. Porém, se comparados os valores de CL₅₀ e CL₉₀ encontrados neste estudo, a susceptibilidade das lagartas da espécie *A. gemmatalis* foi maior que para as de *S. frugiperda*. A proteína Vip3Aa50 foi mais ativa a lagartas de *A. gemmatalis* cerca de 4 vezes do que a lagartas de *S. frugiperda* ao nível de CL₅₀. Sendo esta diferença mais pronunciada ao nível de CL₉₀, no qual a proteína apresenta quase 9 vezes mais eficiência para o controle de *A. gemmatalis*. Os controles negativos não causaram mortalidade às larvas de ambas as espécies durante os ensaios nas condições descritas.

Aranda, et al., (1996) relatou a interação de proteínas Cry com células epitelial do intestino médio de lagartas de *S. frugiperda*. Estes autores consideraram tóxicas as proteínas Cry1C e Cry1D com CL₅₀ de 31 e 77 ng.cm⁻² respectivamente e não tóxicas as proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1B e Cry1E com CL₅₀ superiores a 2000 ng.cm⁻². As proteínas com alto grau de virulência apresentaram saturação e especificidade no processo de interação. Já as não tóxicas como a Cry1Ab apresentaram interação inespecífica, pois a adição de altas concentrações do homólogo não causou efeito negativo na ligação da mesma. A proteína Vip3Aa50 se mostrou altamente virulenta as larvas neonatas de *S. frugiperda* e *A. gemmatalis* se comparadas a este estudo. O modo de ação das proteínas Vip3 ainda não foi totalmente desvendado, porém sua toxicidade elevada como a observada neste estudo podem ser indícios de uma interação com saturação e especificidade no nível de células epitelial do intestino médio destas espécies.

Tabela 2. Virulência de larvas neonatas de *S. frugiperda* e *A. gemmatalis* à pró-toxina Vip3Aa50

Espécie	CL ₅₀ (ng.cm ⁻²) (IC Min. - Máx.) ^a	CL ₉₀ (ng.cm ⁻²) (IC Min. - Máx.) ^a	b ± (EP) ^b	X ²
<i>S. frugiperda</i>	79,6 (51,1 – 129,6)	547,5 (289,4 – 1630,8)	1,5 ± 0,2	1,660
<i>A. gemmatalis</i>	20,3 (14,5 - 27,5)	62,7 (43,5-116,8)	2,6 ± 0,5	0,738

^a (IC Min. - Máx.): Intervalo de confiança (IC 95%); ^b b ± (E P) : Coeficiente angular da reta e Erro Padrão.

A toxicidade das proteínas para as espécies de insetos pragas pode variar em função de diferentes fatores como à ativação de uma mesma pró-toxina em toxina, ou ainda devido a alterações nos receptores da membrana do epitélio intestinal do inseto. A proteólise de pró-toxinas utilizando o suco intestinal de lavas de diferentes espécies pode acarretar diferenças no tempo de ativação, tamanho de fragmentos gerados “*in vitro*” e na atividade inseticida das toxinas “*in vivo*” como observado por Chakroun et al. (2012) para as lagartas de *S. frugiperda* e *S. exigua* e Abdelkefi-Mesrati et al. (2011b) para as lagartas *Anagasta. kuehniella* e *S. littoralis*. Assim como, ação pode ser diferenciada ao nível de receptor como observado por Bergamasco et al. (2013) com a parcial competição das proteínas Vip3Aa e Cry1Ia10 para *S. eridania*, além da maior atividade inseticida da proteína Cry1Ia10 se comparada a Vip3Aa ao nível de CL₅₀, sendo o oposto do observado para *S. frugiperda*, *S. cosmioides* e *S. albula* no mesmo estudo.

Quanto aos ensaios de toxicidade, resultados semelhantes para *S. frugiperda* foram relatados por outros autores, como Sena et al. (2009), que sob condições semelhantes relataram uma CL₅₀ de 49,3 ng.cm⁻² para este inseto praga sendo esta próxima aos limites encontrados neste estudo. Chakroun et al. (2012) observou uma CL₅₀ de 340 ng.cm⁻² para lagartas de *S. frugiperda* com a pró-toxina Vip3Aa16, sendo esta 4 vezes superior a CL₅₀ encontrada neste estudo, porém dentro dos limites da CL₉₀ aqui descrita. O resultado diferiu também de Fang et al. (2007) que, estudando a proteína Vip3Aa1 em ensaio de toxicidade com a mesma espécie obtiveram uma CL₅₀ de 6,9 ng.cm⁻², ou seja cerca de 11 mais ativa a larvas de *S. frugiperda*.

Em estudos realizados por Sena et al. (2009), foram analisadas a toxicidade e a interação de ligação das proteínas Vip3Aa, Vip3Af, Cry1Ab e Cry1Fa à BBMV em lagartas de *S. frugiperda*. Foram resultantes nos ensaios de toxicidade as CL₅₀ de 49,3 ng.cm⁻² para Vip3Aa, de 21 ng.cm⁻² para Vip3Af, de 867 ng.cm⁻² para Cry1Ab e de 170 ng.cm⁻² para Cry1Fa. Portanto, as lagartas desta população se mostram mais sensíveis às proteínas do que às proteínas Cry1. Foi possível observar nos ensaios de ligação que as proteínas Vip3A e Cry1 estudadas têm sítios de ligação independentes nos receptores intestinais deste inseto. Mas ocorre competição pelo mesmo sítio entre as proteínas Cry1Ab e Cry1Fa, assim como Vip3Aa entre Vip3Af. No entanto, para

a lagarta da soja (*A. gemmatalis*) não são encontrados estudos com as proteínas Vip3A, sendo o controle desta descrito principalmente com uso de isolados expressando as toxinas Cry1 (GOBATTO et al., 2010), Cry 2 e Cry9 (FIUZA et al., 2012).

As proteínas Vip3A tem apresentado enorme potencial na aplicação contra insetos não suscetíveis ou resistentes as proteínas Cry, pois apresentam ausência de homologia na sequência de aminoácidos com estas proteínas. Além, das proteínas Vip3 poderem estar junto com as toxinas Cry nas plantas piramidadas para driblar possível resistência desses insetos às culturas Bt, haja vista que as Vip parecem ter outro modo de ação e ocuparem outros receptores diferentes no epitélio intestinal do inseto alvo. Mas, para tanto, há a necessidade de se analisar as combinações de toxinas para cada inseto alvo. Pois possíveis particularidades podem ocorrer como para as lagartas da espécie *S. eridania* que parecem ter um receptor comum para as toxinas Vip3A e Cry11, apesar de serem descritos para outras lagartas do mesmo gênero a independência de receptores para estas proteínas (BERGAMASCO et al., 2013).

Estudos referentes a composição das proteínas Vip3 associados à estudos de função destas proteínas por meio de deleções e/ou fusão de aminoácidos aliados a efeito tóxico à diferentes insetos podem contribuir com o eficaz controle de pragas e retardar a seleção de resistência a toxinas de *B. thuringiensis*. O alto nível de atividade inseticida da proteína Vip3Aa50 do isolado I131, envolvido no presente estudo, o torna excelente candidato como fonte do gene *vip3A* para emprego em plantas transgênicas piramidizadas com genes *cry*.

5. CONCLUSÕES

Os estudos realizados, neste trabalho, permitiram o isolamento e obtenção da sequência de um novo gene *vip3A* a partir do isolado I131 de *B. thuringiensis* pertencente à coleção Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada. A proteína Vip3Aa50, codificada por este gene, foi expressa na forma ativa, demonstrando ser eficiente no controle de larvas neonatas de *S. frugiperda* e *A. gemmatalis*. A população de *A. gemmatalis* utilizada neste estudo mostra-se mais sensível a esta pró-toxina do que a de *S. frugiperda*. Assim os dados encontrados neste trabalho fazem do isolado I131 um candidato altamente promissor como fonte de gene *vip3Aa* para controle de *S. frugiperda* e *A. gemmatalis* por meio da produção de plantas transgênicas.

6. REFERÊNCIAS

ABDELKEFI-MESRATI, L.; ROUIS, S.; SELLAMI, S.; JAOUA, S. *Prays oleae* midgut putative receptor of *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3LB differs from that of Cry1Ac toxin. **Molecular Biotechnology**, v. 43, p. 15–19, 2009.

ABDELKEFI-MESRATI, L.; BOUKEDI, H.; DAMMAK-KARRAY, M.; SELLAMI-BOUDAWARA, T.; JAOUA, S.; TOUNSI, S. Study of the *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa16 histopathological effects and determination of its putative binding proteins in the midgut of *Spodoptera littoralis*. **Journal Invertebrate Pathology**, v. 106, p.250-254, 2011a.

ABDELKEFI-MESRATI, L.; BOUKEDI, H.; CHAKROUN, M.; KAMOUN, F.; AZZOUZ, H.; TOUNSI, S.; ROUIS, S.; JAOUA, S. Investigation of the steps involved in the difference of susceptibility of *Ephestia kuehniella* and *Spodoptera littoralis* to the *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa16 toxin. **Journal Invertebrate Pathology**, v. 107, 198–201, 2011b.

ALI, M. I.; LUTTRELL, R.G. Susceptibility of *Helicoverpa zea* and *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) to Vip3A insecticidal protein expressed in VipCot™ cotton. **Journal Invertebrate Pathology**, v. 108, p. 76–84, 2011.

ALTSCHUL, S. F. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.

ARANDA, E., SANCHEZ, J. PEFEROEN, M., GUERECA, L., BRAVO, A. Interactions of *Bacillus thuringiensis* Crystal Proteins with the Midgut Epithelial Cells of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal Invertebrate Pathology**, v. 68, p. 203–212, 1996.

BEARD, C. E.; COURT, L.; BOETS, A.; MOURANT, R. VAN RIE, J.; AKHURST, R. J. Unusually high frequency of genes encoding vegetative insecticidal proteins in an Australian *Bacillus thuringiensis* collection. **Current Microbiology**, v. 57, p.195–199, 2008.

BERGAMASCO, V. B.; MENDES, D. R. P.; FERNANDES, O. A.; DESIDÉRIO, J. A.; LEMOS, M. V. F. *Bacillus thuringiensis* Cry1a10 and Vip3Aa protein interactions and their toxicity in *Spodoptera spp.* (Lepidoptera). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.112, p. 152–158, 2013.

BHALLA, R.; DALAL, M.; PANGULURI, S. K.; JAGADISH, B.; MANDAOKAR, A. D.; SINGH, A. K.; KUMAR, P. A. Isolation, characterization and expression of a novel vegetative insecticidal protein gene of *Bacillus thuringiensis*. **FEMS Microbiology Letters**, v.243, p. 467-472, 2005.

BRAVO A.; GILL S. S; SOBERÓN M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, v. 49, p. 423-435, 2007.

BRAVO, A.; LIKITVIVATANAVONG, S.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 41, p. 423-431, 2011.

CAROZZI, N. B.; KRAMER, V. C.; WARREN, G. W.; EVOLA, S.; KOZIEL, M. G. Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 3057-3061, 1991.

CERON, J.; COVARRUBIAS, L.; QUINTERO, R.; ORTIZ, A.; ORTIZ, M.; ARANDA, E.; LINA, L.; BRAVO, A. Specific PCR primers directed to identify cry I and cry III genes with in a *Bacillus thuringiensis* strains collection. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 3826-3831, 1995.

CHANKHAMHAENGDECHA, T. S.; TANTICHODOK, A.; PANBANGRED, W. Spore stage expression of a vegetative insecticidal gene increase toxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* SP41 against *Spodoptera exigua*. **Journal of Biotechnology**, v. 136, p. 122-128, 2008.

CHAKROUN, M.; BEL Y.; CACCIA S.; ABDELKEFI-MESRATI, L.; ESCRICHE, B.; FERRÉ, J. Susceptibility of *Spodoptera frugiperda* and *S. exigua* to *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa insecticidal protein. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 110, p. 334-339, 2012.

CHEN, Y.; TIAN, J. C.; SHEN, Z. C.; PENG, Y. F.; HU, C.; GUO, Y. Y.; YE, G. Y. Transgenic rice plants expressing a fused protein of Cry1Ab/Vip3H has resistance to rice stem borers under laboratory and field conditions. **Journal of Economic Entomology**, v. 103, p. 1444-1453, 2010.

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D. R.; FEITELSON, J.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; DEAN, D. H. Revision of the Nomenclature for

the *Bacillus thuringiensis* Pesticidal Crystal Proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 807–813, 1998.

CRUZ, I.; OLIVEIRA, L. J.; OLIVEIRA, A.C.; VASCONCELOS, C. A. Efeito do nível de saturação de alumínio em solo ácido sobre os danos de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) em milho. **Annals of the Entomological Society of Brazil**, v.25, p. 293-297, 1996.

CRUZ, I.; MONTEIRO, M. A. R. Controle Biológico da lagarta-do-cartucho do milho, utilizando o parasitóide de ovos *Spodoptera frugiperda*, *Trichogramma pretiosum*. Sete Lagoas: **Embrapa Milho e Sorgo**, 2004, 4p. (. Comunicado técnico/ Embrapa Milho e Sorgo, ISSN0101-5605, n.98).

DE MAAGD, R. A.; BOSCH, D.; STIEKEMA, W. *Bacillus thuringiensis* toxin-mediated insect resistance in plants. **Trends in Plant Science**, v. 4, p. 9-13, 1999.

DOSS, V.A., KUMAR, K.A., JAYAKUMAR, R.; SEKAR, V. Cloning and expression of the vegetative insecticidal protein (vip3V) gene of *Bacillus thuringiensis* in *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, v. 26, p. 82–88, 2002.

ESTRUCH, J. J.; WARREN, G. W.; MULLINS, M. A.; NYE, G. J.; CRAIG, J. A.; KOZIEL, M. G. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 11, p. 5389-5394, 1996.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequence traces using phred. II Error probabilities. **Genome Research**, v. 8, n. 3, p. 186-194, 1998.

EWING B.; HILLIER L.; WENDL M.C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, v. 8, p.175-185, 1998.

FANG J.; XU X.; WANG P.; ZHAO J. Z.; SHELTON A. M.; CHENG J.; FENG M. G.; SHEM Z. Characterization of chimeric *Bacillus thuringiensis* Vip3 toxins. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 956–961, 2007.

FERRÉ, J.; VAN RIE, J. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology**, v. 47, p.501-533, 2002.

FIGUEIREDO, C. S. 2010. **Identificação e caracterização de genes *vip3* em isolados de *Bacillus thuringiensis* e avaliação da toxicidade a larvas de *Anticarsia gemmatalis* e *Spodoptera frugiperda***. 35p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Ciências Biológicas) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP.

FIUZA, L. M.; SCHÜNEMANN, R.; PINTO, L. M. N.; ZANETTINI, M. H. B. Two new Brazilian isolates of *Bacillus thuringiensis* toxic to *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 72, n. 2, p. 363-369, 2012.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BAPTISTA, G.C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIN, J.D. ; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920p.

GOBATTO, V.; GIANI, S. G.; CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. P.; SPECHT, A.; BARROS, N. M.. *Bacillus thuringiensis* isolates entomopathogenic for *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) and *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 70, n. 4, p. 1039-1046, 2010.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: A graphical tool for sequence finishing. **Genome Reserch**, v. 8, n. 8, p. 195-202, 1998.

GRÜTZMACHER, A.D.; MARTINS, J. F. S.; CUNHA, U. S. Insetos-pragas das culturas do milho e sorgo no agroecossistema de várzea. In: PARFITT, J. M. B. (ed.), **Produção de milho e sorgo em várzea**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, p. 87-102, 2000.

HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C. S.; BOETS, A.; VAN RIE, J.; FERRÉ, J. Screening and identification of vip genes in *Bacillus thuringiensis* strains. **Journal of Applied Microbiology**, v.107, p.219-225, 2009

HANAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Journal of Molecular Biology**, v.166, p. 557–580, 1983.

HOFFMANN-CAMPO C. B.; MOSCARDI, F.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; OLIVEIRA, L. J.; SOSA-GÓMEZ, D. R.; PANIZZI, A. R.; CORSO, I. C.; GAZZONI, D. L.; OLIVEIRA, E. B. **Pragas da soja no Brasil e seu manejo**

integrado -Londrina: Embrapa Soja, 2000. 70p. - (Circular Técnica / Embrapa Soja, ISSN 1516-7860; n.30).

HOFFMANN-CAMPO, C. B.; OLIVEIRA, L. J.; MOSCARDI, F.; GAZZONI, D. L.; FERREIRA, B. S. C.; LORINI, I. A.; BORGES, M.; PANIZZI, A. R.; GOMEZ, D. R. S.; CORSO, I. C. Integrated pest management in Brazil. In: K. M. Maredia; D. Dakouo; D. Mota-Sanchez. (Org.). *Integrated Pest Management in the Global Arena*. Wallingford: CABI Publishing, p. 285-299, 2003.

KNAAK, N.; FIUZA, L. M. Histopathology of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera; Noctuidae) treated with nucleopolyhedrovirus and *Bacillus thuringiensis* serovar kurstaki. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.36, p.196-200, 2005.

KNAAK, N., FRANZ, A. R., SANTOS, G. F. AND FIUZA, L. M. Histopathology and the lethal effect of Cry proteins and strains of *Bacillus thuringiensis* Berliner in *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith Caterpillars (Lepidoptera, Noctuidae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 70, n. 3, p. 677-684, 2010.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of T4 bacteriophage. **Nature**, v. 227, p. 680-681, 1970.

LEE, M.K., WALTERS, F.S., HART, H., PALEKAR, N., CHEN, J.S. **The mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A differs from that of Cry1Ab d-endotoxin.** *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, p. 4648–4657, 2003.

LEE, M. K.; MILES, P.; CHEN, J. S. Brush border membrane binding properties of *Bacillus thuringiensis* Vip3A toxin to *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* midguts. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 339, p. 1043–1047, 2006.

LIMA, G. M. S.; AGUIAR, R. W. S.; CORRÊA, R. F. T.; MARTINS, E. S.; GOMES, A. C. M.; NAGATA, T.; DE-SOUZA, M. T.; MONNERAT, R. G.; RIBEIRO B. M. Cry2A toxins from *Bacillus thuringiensis* expressed in insect cells are toxic to two lepidopteran insects. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 24, n.12, p. 2941-2948, 2008.

LETOWSKI, J.; BRAVO, A.; BROUSSEAU, R.; MASSON, L. Assessment of cry1 gene contents of Bt strains by use of DNA microarrays **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 5391-5398, 2005.

LIU, J.; SONG, F.; ZHANG, J.; LIU, R.; HE, K.; TAN, J.; HUANG, D. Identification of *vip3A*-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains and characterization of a novel *vip3A*-type gene. **Microbiology Letters in Applied**, v.45, p 432-438, 2007.

LOGUERCIO L. L.; BARRETO M. L.; ROCHA T. L.; SANTOS C. G.; TEIXEIRA F. F.; PAIVA E. Combined analysis of supernatant-based feeding bioassays and PCR as a first-tier screening strategy for Vip –derived activities in *Bacillus thuringiensis* strains effective against tropical fall armyworm. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, p. 269–277, 2002.

MACRAE, TED C.; BAUR M. E.; BOETHEL, D. J.; FITZPATRICK, B. J.; GAO, AI-GUO; GAMUNDI, J. C.; HARRISON, L. A.; KABUYE, V. T.; MCPHERSON, R. M.; MIKLOS, J. A.; PARADISE, M. S.; TOEDEBUSCH, A. S.; VIEGAS, A. Laboratory and Field Evaluations of Transgenic Soybean Exhibiting High-Dose Expression of a Synthetic *Bacillus thuringiensis cry1A* Gene for Control of Lepidoptera. **Journal of Economic Entomology**, v. 98, n. 2, p. 577-587, 2005.

MARUCCI, S. C. **Seleção e caracterização de novos genes *vip3A*: genes inseticidas de segunda geração de *Bacillus thuringiensis***. 64p. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2010.

MCPHERSON, R. M.; MACRAE, T. C. Evaluation of transgenic soybean exhibiting high expression of a synthetic *Bacillus thuringiensis cry1A* transgene for suppressing Lepidopteran population densities and crop injury. **Journal of Economic Entomology**, v. 102, p. 1640-1648, 2009.

MENDES, M. S.; MARUCCI, R. C.; MOREIRA, S. G.; WAQUIL, J. M. **Milho Bt: avaliação preliminar da resistência de híbridos comerciais à lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797)**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2008. Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/publica/2008/comunicado/Com_157.pdf> Acesso em: 20 de outubro 2012.

MENDONÇA, E. G.; VISÔTTO, L. E.; COSTA, N. C. S.; RIBEIRO, F. R.; OLIVEIRA, J. A.; OLIVEIRA, M. G. A. Caracterização enzimática de isoformas de cisteíno protease de *Anticarsia gemmatalis* (HÜBNER, 1818). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 3, p. 446-454, 2011.

MESRATI, L.A.; TOUNSI, S; JAOUA, S. Characterization of a novel *vip3*-type gene from *Bacillus thuringiensis* and evidence of its presence on a large plasmid. **FEMS Microbiology Letters**, v. 244, p.353–358, 2005.

PANIZZI, A.R.; CORRÊA-FERREIRA, B. Dynamics in the insect fauna adaptation to soybean in the tropics. **Trends in Entomology**, v.1, p.71-88, 1997.

PRATES, H. T; VIANA, P. A; WAQUIL, J. M. Atividade de extrato aquoso de folhas de nim (*Azadirachta indica*) sobre *Spodoptera frugiperda*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, p. 437-439, 2003

RAUSELL, C., DECKER, N., GARCIA-ROBLES, I., ESCRICHE, B., VAN KERKHOVE, E., REAL, MD. and MARTÍNEZ-RAMÍREZ, AC.,. Effect of *Bacillus thuringiensis* toxins on the midgut of the nun moth *Lymantria monacha*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 75, n. 4, p. 288-291, 2000.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3^a ed. Nova York: Cold Spring Harbor, p. 250, 2001.

SAMPURNA, S.; MAITI, M. K. Molecular characterization of a novel vegetative insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis* effective against sap-sucking insect pest. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 9, p. 937–946, 2011.

SAUKA, D. H.; RODRIGUEZ, S. E.; BENINTENDE, G. B. New variants of lepidopterical toxin genes encoding *Bacillus thuringiensis vip3Aa* proteins. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 6, p. 373-380, 2013.

SELVAPANDIYAN, A.; ARORA, N.; RAJAGOPAL, R.; JALALI, S. K.; VENKATESAN, T.; SINGH, S. P.; BHATNAGAR, R. K. Toxicity analysis of N- and C-terminus-deleted vegetative insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, n.12, p. 5855–5858, 2001.

SENA, J. A. D.; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C. S.; FERRÉ, J. Interaction of *Bacillus thuringiensis* Cry1 and Vip3A proteins with *Spodoptera frugiperda* midgut binding sites. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 7, p. 2236-2237, 2009.

SHEN, J.; HOU, M.; GUO, W. Identification and cloning of *vip3A* genes from isolates of *Bacillus thuringiensis* and their bioactivity analysis. **Wei Sheng Wu Xue Bao**, v. 49, p. 110-116, 2009.

SILVA, M. T. B. Associação de Baculovirus anticarsia com subdosagem de inseticidas no controle de *Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1818). **Ciência Rural**, Santa Maria, v.25, n.3, p. 353-358, 1995.

SILVA-WERNECK, J. O.; ELLAR, D. J. Characterization of a novel Cry9Bb d-endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 98, n. 3, p. 320-328, 2008.

SOBERÓN, M.; GILL, S. S.; BRAVO, A. Signaling versus punching hole: how do *Bacillus thuringiensis* toxins kill insect midgut cells? **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, p.1337-1349, 2009.

SMITS, P. H. Insect pathogens: their suitability as biopesticides, In: EVANS, H. F. (Ed.). **Microbial insecticides: novelty or necessity?** Nottingham: Major Design & Production, p. 21-28, 1997.

STORER, N.P., BABCOCK, J.M., SCHLENZ, M., MEADE, T., THOMPSON, G.D., BING, J.W., HUCKABA, R.M. Discovery and characterization of field resistance to Bt Maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. **Journal of Economic Entomology**, v. 103, p.1031-1038, 2010.

TABASHNIK, B. E. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Reviews Entomology**, v. 39, p. 47-79, 1994.

TOWBIN, H.T., STAETHETIN. A., GORDON, J. Eletroforetic transfer of protein from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: Produce abd some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 76, p. 4350-4354, 1979.

VIDAL-QUIST, J. C.; CASTANERA, P.; GONZALEZ-CABRERA, J. Simple and Rapid Method for PCR Characterization of Large *Bacillus thuringiensis* Strain Collections. **Current Microbiology**, v. 58, p. 421-425, 2009.

WARREN G. W. Vegetative insecticidal proteins: novel proteins for control of corn pests. In: Carozzi NB, Koziel M (eds) *Advances in insect control, the role of transgenic plants*. Taylors & Francis Ltd, London, pp 109–121, 1997

WU, J.; ZHAO, F.; BAI, J.; DENG, G.; QIN, S.; BAO, Q. Evidence for positive darwinian selection of *vip* gene in *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Genetics and Genomics**, v. 34, n.7, p. 649-660, 2007.

YU, C. G.; MULLINS, M. A.; WARREN, G. W.; KOZIEL, M. G.; ESTRUCH, J. J. The *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein vip3A lyses midgut epithelium cells of susceptible insects. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 532-536, 1997.

YU, X.; ZHENG, A.; ZHU, J.; WANG, S.; WANG, L.; DENG, Q.; LI, S.; LIU, H.; LI, P. Characterization of Vegetative Insecticidal Protein *vip* genes of *Bacillus thuringiensis* from Sichuan Basin in China. **Current Microbiology**, v. 62, p. 752–757, 2011.