

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NOVOS GENES *vip3A*:  
GENES INSETICIDAS DE SEGUNDA GERAÇÃO DE *Bacillus*  
*thuringiensis***

**Suzana Cristina Marucci  
Bióloga**

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL  
Dezembro de 2010

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NOVOS GENES *vip3A*:  
GENES INSETICIDAS DE SEGUNDA GERAÇÃO DE *Bacillus  
thuringiensis***

**Suzana Cristina Marucci**

**Orientadora: Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério**

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

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL  
Dezembro de 2010

Marucci, Suzana Cristina  
M389s Seleção e caracterização de novos genes *vip3A*: genes inseticidas de segunda geração de *Bacillus thuringiensis* / Suzana Cristina Marucci. -- Jaboticabal, 2010  
ix, 64 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2010  
Orientador: Janete Aparecida Desidério  
Banca examinadora: Agda Paula Facincani, Irlan Leite de Abreu  
Bibliografia

1. Bactéria entomopatogênica. 2. Proteínas vegetativa inseticida.  
3. Primer Walking. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 631.52:631.461

## DADOS CURRICULARES DA AUTORA

**SUZANA CRISTINA MARUCCI** – nascida em 16 de agosto de 1983, na cidade de Jaboticabal – SP, é Bióloga, graduada no curso de Ciências Biológicas (Licenciatura Plena e Bacharelado com ênfase em Ciências Ambientais) pelo Centro Universitário de Araraquara (UNIARA), Araraquara – SP, título este concedido em Janeiro de 2007. Realizou estágio no Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Jaboticabal de 2006 a 2008, auxiliando no desenvolvimento de projetos de manejo de pragas com o uso de genes *cry* e *vip3A* da bactéria *Bacillus thuringiensis*. Em agosto de 2008, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas), da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Jaboticabal, desenvolvendo a pesquisa da dissertação como bolsista da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

“O futuro pertence àqueles que acreditam  
na beleza de seus sonhos.”

Aos meus pais, Aparecida e Carlos, por todo amor, carinho e incentivo, imprescindíveis para minha formação. Com amor dedico este trabalho a eles por serem meu porto seguro em dias de tormenta.

Ao meu irmão Tiago por todo amor, carinho e alegria.

Ao meu namorado Diego por todo amor, carinho e compreensão ao longo deste trabalho.

**DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

À FAPESP pelo apoio financeiro.

À Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério, pela orientação e importante dedicação durante o desenvolvimento deste trabalho. A ela dedico meus sinceros agradecimentos por sua paciência diante das dificuldades surgidas.

Ao Prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos, pela amizade, atenção e ajuda na realização deste trabalho.

À Eliane Cristina da Cunha Alves, por toda dedicação e ajuda nos experimentos realizados, transmitindo seus conhecimentos sempre com muita alegria e carinho.

À Renata Izabel Dozzi Tezza, por toda atenção e carinho nas ajudas com as análises de bioinformática. Por ter se tornado uma grande amiga, sempre presente nos momentos de dificuldade.

À Profa. Dra. Maria Inês Tiraboschi Ferro e Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro pela disponibilização do laboratório para as análises de bioinformática.

À Profa. Dra. Eliana Gertrudes Macedo Lemos, por permitir o uso de equipamentos de seu laboratório durante a execução dos experimentos.

Aos Doutores Ana Maria Guidelli Thuler, Jackson Antônio Marcondes de Souza, Agda Paula Facincani e Irlan Leite de Abreu pela participação nas bancas examinadoras e valiosas sugestões científicas que muito contribuíram para esta dissertação.

A todos os colegas que atualmente fazem parte do Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada, pela troca de conhecimentos e experiências em todos os momentos que passamos juntos.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FCAV/UNESP), ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) e aos docentes desta instituição, pelas disciplinas ministradas, pelo conhecimento intelectual adquirido e pela oportunidade de realizar este trabalho.

A toda minha família, pelo incentivo e carinho durante a realização deste trabalho.

Em especial a Deus, por me dar o dom da vida e a possibilidade de vencer mais esta etapa.



## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
RESUMO.....	viii
SUMMARY.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	03
2.1. <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	03
2.2. Proteína Vip3 de <i>B. thuringiensis</i> .....	07
2.3. Resistência de insetos as toxinas de <i>B. thuringiensis</i> .....	09
2.4. Uso da técnica de PCR e sequenciamento para a seleção de novos genes de <i>B. thuringiensis</i> .....	11
3. OBJETIVOS.....	14
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
4.1. Linhagens e isolados de <i>B. thuringiensis</i> .....	15
4.2. Cultivo das bactérias e extração do DNA genômico.....	15
4.3. Identificação dos isolados de <i>B. thuringiensis</i> portadores de genes <i>vip3A</i> potencialmente novos.....	16
4.3.1. Confirmação da presença de genes <i>vip3A</i> potencialmente novos nos isolados selecionados.....	18
4.4. Sequenciamento do fragmento N-terminal dos genes <i>vip3A</i> potencialmente novos.....	19
4.5. Análise dos dados gerados por sequenciamento.....	21
4.6. Obtenção dos genes <i>vip3A</i> completos.....	21
4.7. Clonagem dos genes <i>vip3A</i> completos.....	22
4.8. Sequenciamento dos genes <i>vip3A</i> completos por meio da estratégia de “primer walking”.....	24

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
5.1. Identificação dos isolados de <i>B. thuringiensis</i> portadores de genes <i>vip3A</i> potencialmente novos.....	26
5.1.1. Confirmação da presença de genes <i>vip3A</i> potencialmente novos nos isolados selecionados.....	29
5.2. Sequenciamento do fragmento N-terminal do isolado I187.....	30
5.3. Amplificação do gene <i>vip3A</i> completo do isolado I187 de <i>B. thuringiensis</i> e das linhagens padrão.....	31
5.4. Clonagem dos genes <i>vip3A</i> completos.....	32
5.5. Análise das sequências completas dos genes <i>vip3A</i> .....	34
5.5.1. Análise do gene <i>vip3Aa</i> da linhagem padrão <i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> HD1.....	34
5.5.2. Análise do gene <i>vip3Aa</i> da linhagem padrão <i>B. thuringiensis</i> var. <i>tolworthi</i> HD125.....	40
5.5.3. Análise do gene <i>vip3A</i> do isolado I187 de <i>B. thuringiensis</i> .....	44
6. CONCLUSÕES.....	52
7. REFERÊNCIAS.....	53

## LISTA DE TABELAS

	Página
<b>Tabela 1.</b> Oligonucleotídeos iniciadores elaborados por FANG et al. (2007), utilizados na identificação dos isolados de <i>B. thuringiensis</i> portadores de genes <i>vip3A</i> potencialmente novos.....	17
<b>Tabela 2.</b> Reagentes utilizados nas reações de amplificação.....	17
<b>Tabela 3.</b> Condições de termociclagem da reação de PCR.....	18
<b>Tabela 4.</b> Oligonucleotídeos iniciadores elaborados por LOGUERCIO et al. (2002) específicos para o gene <i>vip3Aa</i> .....	19
<b>Tabela 5.</b> Reagentes utilizados nas reações de sequenciamento.....	20
<b>Tabela 6.</b> Condições de termociclagem utilizada nas reações de sequenciamento.....	20
<b>Tabela 7.</b> Condições de termociclagem utilizada nas reações de amplificação do gene <i>vip3A</i> completo do isolado de <i>B. thuringiensis</i> .....	22
<b>Tabela 8.</b> Reagentes utilizados nas reações de amplificação dos clones positivos.....	24
<b>Tabela 9.</b> Condições de termociclagem utilizada para amplificação dos clones positivos.....	24
<b>Tabela 10.</b> Oligonucleotídeos iniciadores elaborados na estratégia “primer walking” para a obtenção dos genes <i>vip3A</i> completos.....	25

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<p><b>Figura 1.</b> Análise virtual gerada pelo programa pDRAW32 indicando os sítios de pareamento dos oligonucleotídeos iniciadores V1F-V1R e V2F-V2R elaborados por FANG et al. (2007), com base na sequência do gene <i>vip3Aa1</i>.....</p>	27
<p><b>Figura 2.</b> Eletroforograma evidenciando a amplificação das regiões V1F-V1R e V2F-V2R do gene <i>vip3A</i> nas amostras de <i>B. thuringiensis</i>. <b>A</b> - MM: Marcador Molecular 1Kb DNA Ladder; 1 a 8: Isolados de <i>B. thuringiensis</i> portadores das regiões V1F-V1R e V2F-V2R do gene <i>vip3Aa</i>; 9: Controle Positivo – <i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> HD1; 10: Controle Positivo – <i>B. thuringiensis</i> var. <i>tolworthi</i> HD125; 11: Controle Negativo – <i>B. thuringiensis</i> var <i>tenebrionis</i> (coleóptero – específico). <b>B</b> - MM: Marcador Molecular 1Kb DNA Ladder; 1 a 9: Isolados de <i>B. thuringiensis</i> portadores das regiões V1F-V1R; 10: Controle Positivo – <i>B. thuringiensis</i> var. HD125; CN: Controle Negativo – <i>B. thuringiensis</i> var. <i>tenebrionis</i> (coleóptero – específico).....</p>	28
<p><b>Figura 3.</b> Análise virtual gerada pelo programa pDRAW32 indicando os sítios de pareamento dos oligonucleotídeos iniciadores Vip5-Vip2 e Vip3-Vip6 elaborados por LOGUERCIO et al. (2002), com base na sequência do gene <i>vip3Aa1</i>.....</p>	29
<p><b>Figura 4.</b> Eletroforograma evidenciando a amplificação da região Vip5-Vip2 do gene <i>vip3A</i> nas amostras de <i>B. thuringiensis</i>. M: Marcador Molecular 1Kb DNA Ladder; HD1: Linhagem Padrão <i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> HD1 (Controle positivo); HD125 Linhagem Padrão <i>B. thuringiensis</i> var. <i>tolworthi</i> HD125 (Controle positivo); I187: Isolado I187 de <i>B. thuringiensis</i>; CN: Linhagem Padrão <i>B. thuringiensis</i> var. <i>tenebrionis</i> (Controle negativo).....</p>	30

**Figura 5.** Eletroforograma evidenciando a amplificação do gene *vip3A* completo nas amostras de *B. thuringiensis*. M - Marcador Molecular 1Kb DNA Ladder; HD1 - Linhagem Padrão *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD1 (Controle positivo); HD125 - Linhagem Padrão *B. thuringiensis* var. *tolworthi* HD125 (Controle positivo); I187 - Isolado I187 de *B. thuringiensis*; Ten - Linhagem Padrão *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* (Controle negativo); CN - Controle negativo da reação (Água)..... 32

**Figura 6.** Eletroforograma evidenciando a confirmação dos clones positivos através da amplificação com os oligonucleotídeos T7 e SP6. M - Marcador Molecular 1Kb DNA Ladder; 1, 8 e 9 - Clones positivos com tamanho esperado de 2570 pb; 2 a 7 - Clones negativos..... 33

**Figura 7.** Sequência de nucleotídeos e deduzida de aminoácidos do gene *vip3Aa43* (GenBank: [HQ594534]) obtido a partir da linhagem padrão *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD1. A metionina inicial e o códon de parada estão representados em negrito e em destaque estão os oligonucleotídeos utilizados na estratégia de “primer walking”, onde em verde estão os oligonucleotídeos direto e em amarelo os oligonucleotídeos reverso..... 36

**Figura 8.** Alinhamento da sequência do gene *vip3Aa43* obtido a partir da linhagem padrão *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD1, realizado dia 19 de setembro de 2010, utilizando o algoritmo BLASTX, da ferramenta BLAST, disponível publicamente na página do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)..... 37

**Figura 9.** Proteínas Vip3Aa classificadas no banco de dados *Bacillus thuringiensis*: Toxin Nomenclature (CRICKMORE et al. 2010), que apresentaram similaridade a proteína Vip3Aa43 obtida a partir da linhagem padrão *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD1..... 37

- Figura 10.** Alinhamento da sequência de aminoácidos da proteína Vip3Aa43 obtida a partir da linhagem padrão *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD1 com as proteínas Vip3Aa depositadas nos bancos de dados de proteínas do NCBI..... 39
- Figura 11.** Sequência de nucleotídeos e deduzida de aminoácidos do gene *vip3Aa42* (GenBank: [HQ587048]) obtido a partir da linhagem padrão *B. thuringiensis* var. *tolworthi* HD125. A metionina inicial e o códon de parada estão representados em negrito e em destaque estão os oligonucleotídeos utilizados na estratégia de “primer walking”, onde em verde estão os oligonucleotídeos direto e em amarelo os oligonucleotídeos reverso..... 41
- Figura 12.** Alinhamento da sequência do gene *vip3Aa42* obtido a partir da linhagem padrão *B. thuringiensis* var. *tolworthi* HD125, realizado dia 19 de setembro de 2010, utilizando o algoritmo BLASTX, da ferramenta BLAST, disponível publicamente no NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)..... 42
- Figura 13.** Alinhamento da sequência de nucleotídeos do gene *vip3Aa42* obtido a partir da linhagem padrão *B. thuringiensis* var. *tolworthi* HD125 com o gene *vip3Aa35*. Em amarelo estão destacadas as substituições de nucleotídeos. Em vermelho estão delimitados os códons cujas substituições de nucleotídeos geraram alterações nos aminoácidos..... 42
- Figura 14.** Alinhamento da sequência de aminoácidos da proteína Vip3Aa42 obtida a partir da linhagem padrão *B. thuringiensis* var. *tolworthi* HD125 com a proteína Vip3Aa35. Em amarelo estão destacadas as substituições de aminoácidos: treonina por alanina e glicina por ácido glutâmico..... 43

- Figura 15.** Sequência de nucleotídeos e deduzida de aminoácidos do gene *vip3Ag5* (GenBank: [HQ542193]) obtido a partir do isolado I187 de *B. thuringiensis*. A metionina inicial e o códon de parada estão representados em negrito e em destaque estão os oligonucleotídeos utilizados na estratégia de “primer walking”, onde em verde estão os oligonucleotídeos direto e em amarelo os oligonucleotídeos reverso..... 46
- Figura 16.** Alinhamento da sequência do gene *vip3Ag5* obtido a partir do isolado I187 de *B. thuringiensis*, realizado dia 19 de setembro de 2010, utilizando o algoritmo BLASTX, da ferramenta BLAST, disponível publicamente na página do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)..... 47
- Figura 17.** Alinhamento da sequência de nucleotídeos do gene *vip3Ag5* obtido a partir do isolado I187 de *B. thuringiensis* com o gene *vip3Ag2*. Em amarelo estão destacadas as substituições de nucleotídeos. Em preto estão delimitados os códons cujas substituições de nucleotídeos não geraram alterações nos aminoácidos e em vermelho os códons cujas substituições de nucleotídeos geraram alterações nos aminoácidos..... 48
- Figura 18.** Alinhamento da sequência de aminoácidos da proteína Vip3Ag5 obtida a partir do isolado I187 de *B. thuringiensis* com a proteína Vip3Ag2. Em amarelo estão destacadas as substituições de aminoácidos: arginina por glutamina, treonina por metionina e prolina por serina..... 49

## SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NOVOS GENES *vip3A*: GENES INSETICIDAS DE SEGUNDA GERAÇÃO DE *Bacillus thuringiensis*

**RESUMO** - Como uma alternativa para diminuir as agressões constantes que o ecossistema vem sofrendo, devido à grande quantidade de produtos químicos utilizados no controle de pragas, pesquisas envolvendo microrganismos capazes de promover o controle biológico tem se intensificado. Dentre estes microrganismos a bactéria *Bacillus thuringiensis* tem se destacado. Essa bactéria caracteriza-se pela produção de proteínas tóxicas a representantes de diversas ordens de insetos. Em particular, as proteínas Vip3A, estão em amplo estudo devido a sua especificidade, alto potencial ativo e como alternativa para o controle da resistência de insetos às proteínas Cry. Diante disto, o objetivo deste trabalho foi selecionar, a partir de 1080 isolados de diferentes regiões brasileiras, aqueles portadores de genes *vip3A* e obter a sequência de nucleotídeos completa dos mesmos. As linhagens padrão *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD1, *B. thuringiensis* var. *tolworthi* HD125 e o isolado I187 tiveram seus DNAs amplificados com oligonucleotídeos baseados na sequência de genes *vip3A*, descritos no banco de dados de *B. thuringiensis* e, a partir dos amplicons obtidos, a sequência completa de nucleotídeos dos mesmos foi determinada, utilizando-se da estratégia de “primer walking”. A proteína Vip3Aa43 (GenBank: [HQ594534]) da linhagem HD1 demonstrou ser 100% idêntica às proteínas Vip3Aa já descritas. Já as proteínas Vip3Aa42 (GenBank: [HQ587048]) da linhagem HD125 e Vip3Ag5 (GenBank: [HQ542193]) do isolado I187 demonstraram similaridade de 99% com as proteínas descritas Vip3Aa35 e Vip3Ag2, respectivamente, demonstrando serem duas novas proteínas Vip3A, devido às substituições de aminoácidos ocorridas. Os três genes *vip3A* obtidos poderão ser utilizados na produção de plantas Bt, piramidadas ou não, visando ao manejo da resistência dos insetos praga.

**Palavras-Chave:** Bactéria entomopatogênica, proteínas vegetativa inseticida, “primer walking”, controle biológico



## SELECTION AND CHARACTERIZATION OF NOVEL *vip3A* GENES: A SECOND GENERATION OF *Bacillus thuringiensis* INSECTICIDAL GENES

**SUMMARY** - As an alternative to decrease the constant aggressions that the ecosystem has suffered due to the large amount of chemical products used in pest control, researches involving microorganisms able to promoting biological control have been intensified. Among these microorganisms the bacterium *Bacillus thuringiensis* has been stood out. This bacterium is characterized by the production of toxic proteins to representatives of several insect orders. In particular, the Vip3A proteins are in large study due to its specificity, and high active potential as an alternative to control of insect's resistance to Cry proteins. According to this, the aim of this work was to select from 1080 isolates in different Brazilian regions, those carrying *vip3A* genes and obtain the complete nucleotide sequence of the same. The standard strains *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD1, *B. thuringiensis* var. *tolworthi* HD125 and the isolate I187 had their DNA amplified with primers based on *vip3A* gene sequence described in database of *B. thuringiensis*, and from the amplicons obtained, the full sequence of nucleotides was determined, by the use of the strategy of "primer walking". The protein Vip3Aa43 (GenBank: [HQ594534]) of HD1 strain showed to be 100% identical to Vip3Aa proteins already described. However, the proteins Vip3Aa42 (GenBank: [HQ587048]) of HD125 strain and Vip3Ag5 (GenBank: [HQ542193]) of the isolate I187 showed 99% similarity with the Vip3Aa35 and Vip3Ag2 proteins described, respectively, showing been two new Vip3A proteins due to amino acid substitutions occurred. The three *vip3A* genes obtained can be used in the production of Bt crops, pyramidal or not, aiming to resistance management of pest insects.

**Keywords:** Entomopathogenic bacteria, vegetative insecticidal proteins, primer walking, biological control

## 1. INTRODUÇÃO

Um dos grandes desafios para a consolidação da agricultura sustentável continua sendo o ataque de pragas que, quando não controladas, podem reduzir drasticamente a produção. Os danos que elas causam à agricultura são de grande importância econômica acarretando enormes prejuízos, não somente às plantas, mas também aos animais domésticos e ao próprio homem. Segundo FERRY et al. (2006), os insetos herbívoros são responsáveis por cerca de 10 a 20% de perdas mundiais das grandes culturas.

O controle destes insetos praga é realizado em todo o mundo, principalmente através do uso de produtos químicos, sendo o Brasil, o terceiro maior consumidor destes produtos.

No entanto, por não serem seletivos, os produtos químicos atingem os inimigos naturais de muitas pragas, além de contaminar os alimentos, o solo, e a água. Fato este que gera uma grande preocupação com a saúde humana, devido aos casos crescentes de câncer, creditados à ingestão de alimentos contaminados por agrotóxicos (RENDEIRO, 2006). Além disso, o uso contínuo desses produtos químicos tem selecionado populações resistentes, o que gera como consequências um aumento da frequência das aplicações de pesticidas, aumento na dosagem do produto e substituição por outro produto, geralmente de maior toxicidade (GEORGHIOU, 1983).

Por estes motivos, tem-se intensificado o número de pesquisas envolvendo microrganismos capazes de promover o controle biológico de pragas agrícolas e de interesse na saúde pública.

Entre estes microrganismos, a bactéria *Bacillus thuringiensis* (Berliner, 1915) é considerada a espécie de maior interesse, sendo caracterizada pela produção de cristais protéicos com atividade inseticida durante a esporulação. Esses cristais são compostos por proteínas que exibem alta atividade específica contra larvas de insetos de várias ordens (FEITELSON et al. 1992), além de dípteros vetores de doenças humanas (DE MAAGD et al. 2003).

Esse agente de controle biológico tem alta especificidade e é relativamente seguro para organismos não alvo, mas apresenta limitações relativas à persistência e eficiência. Essas limitações levaram pesquisadores a investir no desenvolvimento de culturas geneticamente modificadas para expressar toxinas oriundas desta bactéria, denominadas plantas Bt.

No entanto, um dos principais riscos ambientais associados às culturas inseticidas é o potencial de evolução de resistência em pragas alvo. Os insetos podem evoluir em resposta à seleção natural imposta pelos métodos de controle, limitando sua eficiência e viabilidade a longo prazo (HAWTHORNE, 1998).

Como uma alternativa ao manejo de resistência dos insetos as proteínas Cry, existe uma nova classe de proteínas, produzidas durante o estágio de crescimento vegetativo da bactéria *B. thuringiensis*, denominadas proteínas inseticida vegetativa (Vip), que estão em amplo estudo devido a sua especificidade e alto potencial ativo (ESTRUCH et al. 1996).

Devido à sua forma não cristalina, estas proteínas se ligam mais rapidamente aos receptores de membrana das células epiteliais do intestino do inseto suscetível resultando em progressiva degeneração da camada epitelial (YU et al. 1997; LEE et al. 2003).

A interação das proteínas Vip com os receptores do intestino das larvas de diferentes lepidópteros tem colocado essas proteínas como uma segunda geração de toxinas de *B. thuringiensis*. Portanto, a seleção de novos genes *vip* lepidópteros específicos, sua caracterização molecular, clonagem e expressão, tornam-se de grande importância no sentido de contribuir para a busca de alternativas eficazes no controle de pragas agrícolas e no manejo da resistência destas pragas aos bioinseticidas a base de proteínas Cry de *B. thuringiensis*. Neste sentido, o presente trabalho teve por objetivo a seleção e caracterização de novos genes *vip3A* a partir de 1080 isolados de *B. thuringiensis* provenientes de diferentes regiões brasileiras, a fim de se obter a sequência completa de nucleotídeos dos mesmos, para que possam ser utilizados em conjunto ou em rotação na produção de plantas Bt.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. *Bacillus thuringiensis*

*B. thuringiensis* (Bt) é uma bactéria entomopatogênica, Gram-positiva, aeróbia ou facultativamente anaeróbia, quimioheterotrófica, cuja temperatura ideal de crescimento é de 30°C. Possui forma de bastonete e quando em condições específicas, em geral desfavoráveis ao seu crescimento, desenvolve um ciclo de esporulação típico dos bacilos. Essa bactéria é encontrada naturalmente no solo além de outros substratos como superfícies de plantas, produtos armazenados e insetos (AZEVEDO et al. 2000).

No início de sua esporulação são sintetizadas grandes quantidades de proteínas que possuem atividade inseticida. As proteínas acumuladas formam um corpo de inclusão cristalina, razão pela qual elas são denominadas Cry (YAMAMOTO & DEAN, 2000). Esta inclusão protéica é o fator que caracteriza a espécie de *B. thuringiensis* e confere a muitas linhagens o potencial entomopatogênico.

Segundo SCHNEPF et al. (1998), as proteínas Cry ou  $\delta$ -endotoxinas são altamente tóxicas para os insetos suscetíveis e inofensivas para outros organismos, incluindo insetos benéficos.

Quanto ao modo de ação das  $\delta$ -endotoxinas de *B. thuringiensis*, o modelo atual tem sido estudado principalmente em lepidópteros, ainda que certos trabalhos mostrem características muito similares em outras ordens de insetos. A ingestão é o primeiro passo de toda uma série de acontecimentos no interior do inseto e que dará lugar à sua morte, por inanição, septicemia ou colapso osmótico.

Após a ingestão, os cristais de *B. thuringiensis* passam praticamente intactos através da primeira porção do tubo digestivo. Posteriormente, e principalmente em função do pH intestinal do inseto, das características e composição do cristal, estes serão solubilizados liberando peptídeos sem atividade inseticida que recebem o nome de protoxinas. Existem evidências que mostram que a velocidade de solubilização depende do pH. Estudos com *Anagasta kuehniella*, inseto com um pH intestinal pouco

alcalino, mostraram uma lenta dissolução do cristal. Ao contrário, em *Bombyx mori*, cujo pH intestinal está em torno de 10, em poucos minutos de ingestão já começa a aparecer sintomas de infecção. Cada tipo de toxina terá suas condições ótimas de solubilização, assim as toxinas ativas contra lepidópteros se dissolvem em pH alcalino, enquanto as toxinas ativas contra coleópteros o fazem em pH neutro (KOLLER et al. 1992).

Ao mesmo tempo em que se solubilizam as protoxinas, estas são ativadas pela ação das proteases intestinais. Não há informações suficientes sobre quais os tipos de enzimas que estão envolvidas no processamento das toxinas (MONNERAT & BRAVO, 2000). Entretanto, TERRA & FERREIRA (1994) mostraram que a principal protease digestiva de lepidópteros e dípteros é a do tipo serino-protease.

A combinação de proteínas proteoliticamente ativadas possui um papel importante na determinação da especificidade aos insetos. Pode-se citar, por exemplo, o caso da toxina Cry1Ab da linhagem *B. thuringiensis* var. *aizawai* que é tóxica para lepidópteros, como *Pieris brassicae*, quando processada com tripsina e tóxica para dípteros, como por exemplo, *Aedes aegypti* quando tratada com suco gástrico desse mosquito (HAIDER & ELLAR, 1989).

Após serem ativadas por proteases do intestino médio, as proteínas Cry ligam-se a receptores específicos localizados nas microvilosidades apicais das membranas das células colunares do intestino dos insetos suscetíveis (HOFFMANN et al. 1988; BRAVO et al. 1992). A união a estes sítios é uma etapa determinante na especificidade das  $\delta$ -endotoxinas, motivo pelo qual, diversos grupos de pesquisa têm se dedicado ao entendimento desse processo (MONNERAT & BRAVO, 2000).

Esta união se realiza em dois passos. O primeiro, de caráter reversível, consiste na interação entre a toxina e o receptor e o segundo passo, de caráter irreversível, dá lugar ao complexo toxina-receptor (LIANG et al. 1995). Esta união, ainda que necessária, não é suficiente para determinar que uma proteína Cry resulte tóxica contra um determinado inseto. Mediante o estudo da interação entre toxinas Cry e BBMV ("Brush Border Membrane Vesicles"), preparadas a partir de diferentes insetos, tem-se

conseguido determinar a especificidade das toxinas Cry em muitos insetos (HERRERO & FERRÉ, 2001).

Para a formação do poro, lise celular e morte do inseto há o desenvolvimento de uma série de etapas, desde que a toxina Cry se une ao seu receptor. Estas ainda são desconhecidas, ainda que a hipótese de lise coloideosmótica seja aceita (KNOWLES & ELLAR, 1987).

De acordo com este modelo, a abertura das membranas das células do intestino médio por ação das proteínas Cry permitirá a entrada de água no interior das células devido à elevada concentração de solutos não difusíveis nas mesmas. Isto provocaria um inchaço que finalmente produziria a lise celular.

Outra classe de proteína produzida pela bactéria *B. thuringiensis* é chamada Vip (Proteína Inseticida Vegetativa), que diferentemente das  $\delta$ -endotoxinas, é uma classe de proteínas produzida por algumas linhagens de *B. thuringiensis*, durante o estágio vegetativo de seu crescimento, sendo secretada no meio de cultura como proteína solúvel (ESTRUCH et al. 1996). Estas estão em amplo estudo devido a sua especificidade, alto potencial ativo e como alternativa para o controle da resistência de insetos às proteínas Cry, representando a segunda geração de toxinas inseticidas que podem ser usadas no controle de insetos pragas importantes com grande eficiência.

As proteínas Vip não têm homologia de sequência ou estrutura com as proteínas Cry (RANG et al. 2005). Na primeira classe de proteínas Vip, estão classificadas as proteínas Vip3A, que consistem de proteínas de 88,5 kDa, ativas contra um amplo espectro de insetos lepidópteros, incluindo *Agrotis ipsilon*, *Spodoptera exigua*, *S. frugiperda*, *Heliiothis virescens*, e *Helicoverpa zea*, alguns dos quais têm baixa suscetibilidade à maioria das endotoxinas (ESTRUCH et al. 1996; YU et al. 1997). A segunda classe consiste de um sistema binário composto de duas proteínas, Vip1 e Vip2, as quais têm 100 kDa e 52 kDa, respectivamente, e são tóxicas para certas espécies de coleópteros (ESPINASSE et al. 2003).

Além das proteínas Cry e Vip, os isolados de *B. thuringiensis* podem sintetizar proteínas denominadas Cyt, que possuem atividade citolítica *in vitro* e especificidade *in vivo* aos dípteros (HÖFTE & WHITHELEY, 1989; DE MAAGD et al. 2003). De acordo

com esses autores fazem parte desse grupo as proteínas Cyt1Ca e Cyt2Aa e seu modo de ação também pode estar relacionado a um sinergismo com outras toxinas produzidas pelos isolados.

O entomopatógeno também produz outros fatores de virulência, como as - exotoxinas,  $\alpha$ -exotoxinas, hemolisinas, enterotoxinas, quitinases e fosfolipases (HÖFTE & WHITELEY, 1989; DE MAAGD et al. 2001). Esses autores declaram desconhecida a exata contribuição de cada fator na virulência da bactéria, sendo uma dificuldade determinar o espectro tóxico de um isolado que sintetiza mais de uma proteína. Isso porque, quando os fragmentos tóxicos vão se ligar aos receptores da membrana do intestino médio do inseto, ocorre uma competição pelos sítios de ligação, que pode interferir na toxicidade do isolado. Daí a importância de se obter os genes isolados, clonados e expressos em sistemas heterólogos para que se possa atribuir a toxicidade ao gene único.

Os produtos à base de *B. thuringiensis* constituem de 1 a 2% do mercado global de inseticidas, estimado em 8 bilhões de dólares por ano, representando 100 milhões de dólares em vendas anuais (NESTER et al. 2002), possuem como característica uma boa estabilidade visto que não necessitam de condições especiais de armazenamento e, segundo CERÓN (2004), existem aproximadamente 60 produtos à base de *B. thuringiensis*.

Portanto, *B. thuringiensis* torna-se um candidato natural para controlar insetos pragas e diminuir o uso excessivo de pesticidas, grande responsável pelos poluentes e contaminação do meio ambiente.

Neste sentido, um aspecto muito importante no desenvolvimento de novos bioinseticidas é a descoberta de estirpes com maior atividade e melhor adaptadas às condições ambientais onde esses produtos serão utilizados (DIAS, 1992), principalmente porque os insetos têm demonstrado uma série de mecanismos de resistência às proteínas de *B. thuringiensis* (GRIFFITTS & AROIAN, 2005).

Vários laboratórios têm realizado pesquisas sobre o isolamento, produção e modificação genética de linhagens de *B. thuringiensis* visando à obtenção de novos isolados mais eficazes do ponto de vista do controle biológico. No Brasil, vários centros

de pesquisas tais como FIOCRUZ do Rio de Janeiro – RJ (CAVADOS et al. 1998), EMBRAPA – Milho e Sorgo de Sete Lagoas – MG (VALICENTE et al. 2000), UNISINOS de São Leopoldo – RS (AZAMBUJA et al. 2001), LGBBA - UNESP Jaboticabal – SP (FATORETTO et al. 2007; THULER et al. 2007; DAVOLOS et al. 2009; COSTA et al. 2010) entre outros, estão buscando novos isolados de *B. thuringiensis* com potenciais tóxicos diferentes dos já conhecidos, tanto para a elaboração de novos bioinseticidas, como também para serem doadores de novos genes que poderão ser empregados na construção de plantas piramidadas, com mais de um transgene, para evitar assim, possível resistência pelos insetos praga.

## 2.2. Proteína Vip3 de *B. thuringiensis*

A nova classe de proteínas chamadas Vip, produzidas por *B. thuringiensis*, diferentemente das  $\delta$ -endotoxinas cuja expressão é restrita na esporulação, são expressas no estágio vegetativo de crescimento. A proteína Vip não possui homologia com proteínas conhecidas. O gene *vip3A* prevê uma proteína com 791 aminoácidos e massa molecular de 88,5 kDa (ESTRUCH et al. 1996).

De acordo com ESTRUCH et al. (1996) o gene *vip3A* codificador da proteína Vip3A inicia sua expressão durante a fase de crescimento vegetativo e continua ativamente expresso em culturas esporulantes. Altos níveis de expressão em combinação com alta estabilidade da proteína favorecem a produção de grandes somas de proteína nos sobrenadantes de culturas esporulantes.

As proteínas Vips são classificadas em quatro classes diferentes (CRICKMORE et al. 2010). As classes Vip1 e Vip2 são componentes de uma proteína binária com atividade inseticida contra *Diabrotica virgifera* e *D. longicornis* (WARREN, 1997; HAN et al. 1999). A proteína Vip3 possui atividade inseticida contra um grande espectro de insetos praga de importância agrônômica da ordem Lepidoptera e revela alta bioatividade para: *Agrotis ipsilon*, *Spodoptera frugiperda*, *S. exigua*, *Heliiothis virescens*, *Helicoverpa zea* e *Plutella xylostella* (ESTRUCH et al, 1996; DOSS et al. 2002; LIU et



al, 2007). Quanto à proteína Vip4, até o momento, não existem trabalhos relatando sua especificidade.

O modo de ação da proteína Vip3A não foi totalmente esclarecido, este tem sido examinado e mostra estar no nível do epitélio intestinal do inseto assim como as proteínas Cry. Porém, devido à sua forma não cristalizada, estas proteínas se ligam mais rapidamente aos receptores de membrana das células epiteliais do intestino do inseto suscetível resultando em progressiva degeneração da camada epitelial (YU et al. 1997; LEE et al. 2003)

Em estudos realizados por SCHNEPF et al. (1998) verificou-se que a extensão C-terminal, encontrada nas proteínas Cry mais longas, não faz parte da toxina ativa, pois é digerida pelas proteases no intestino dos insetos, mas pode ter ação na formação do cristal.

Por outro lado, estudos realizados por SELVAPANDIYAN et al. (2001) demonstraram diferenças no modo de ação da proteína Vip3Aa9 contra diferentes pragas, quando realizado deleções na região N-terminal e C-terminal da proteína. Para determinar a mínima atividade do fragmento tóxico, estas deleções foram construídas, expressadas em *E. coli* e avaliadas em ensaios com larvas de *Chilo partellus* e *S. litura*. Verificou-se que a deleção de 39 aminoácidos da região N-terminal não alterou a toxicidade contra larvas de *C. partellus*, por outro lado, foi observada uma redução da atividade tóxica contra larvas de *S. litura*. Já a deleção de até 154 aminoácidos na região C-terminal, causou uma leve redução na mortalidade de larvas de *C. partellus* e aboliu totalmente a atividade tóxica contra *S. litura*.

Estes resultados sugerem que a toxicidade contra duas diferentes pragas é mediada possivelmente por diferentes mecanismos, porém devido à ausência de informações sobre os receptores de toxinas Vip, não é possível especular sobre os fatores responsáveis pela diferença de toxicidade observada com a deleção da região C-terminal da proteína (SELVAPANDIYAN et al. 2001).

As proteínas Vip possuem toxicidade da mesma magnitude como as das proteínas Cry contra insetos suscetíveis (DONOVAN et al. 2001), e inclui certas pragas importantes, as quais têm mostrado insensibilidade para as proteínas Cry (BHALLA et

al. 2005). No caso da *Agrotis ipsilon*, a proteína Vip3A proporciona um aumento de 260 vezes na atividade inseticida em relação a algumas proteínas Cry1A relatadas como sendo ativas contra esta praga (MACINTOSH et al. 1990; ESTRUCH et al. 1996). Em um estudo realizado por AZOL (2006) a proteína Vip3A teve uma eficiência de 62% na mortalidade das larvas de *S. frugiperda* quando alimentadas com dieta artificial contendo a proteína Vip3A obtida a partir do sobrenadante.

Devido a sua especificidade e alto potencial ativo, já existem linhagens de culturas transgênicas de algodão e milho, expressando somente a Vip3A (JACKSON et al. 2007), ou em conjunto com proteínas Cry, como linhagens de algodão e milho expressando Cry1Ab e Vip3A (DIVELY, 2005; O'CALLAGHAM et al. 2005).

A descoberta da proteína Vip3A foi muito importante para o controle biológico de insetos pragas, pois, segundo MONNERAT & BRAVO (2000), atualmente não só se aproveitam as misturas de esporos e cristais, obtidos após o cultivo de *B. thuringiensis*, como também é possível utilizar o seu sobrenadante. Sendo extremamente relevante a ausência de similaridade nas sequências de aminoácidos destas proteínas com as sequências de aminoácidos das endotoxinas, especialmente, em termos de manejo de resistência FANG et al. (2007).

### **2.3. Resistência de insetos as toxinas de *B. thuringiensis***

Resistência é definida como a capacidade, adquirida por meio de um processo evolutivo, de um organismo sobreviver em resposta à pressão de seleção imposta pela exposição a algum agente tóxico. Pragas alvo evoluem em resposta à seleção natural imposta pelos métodos de controle limitando sua eficiência e viabilidade em longo prazo (HAWTHORNE, 1998).

Os casos de resistência não se limitam a inseticidas sintéticos, mas incluem uma ampla gama de produtos naturais incluindo reguladores de crescimento e agentes de controle biológico, entre eles as toxinas produzidas por *B. thuringiensis* (*Bt*).

Formulações contendo a toxina *Bt* tinham sido usadas por mais de quarenta anos como inseticidas sem nenhuma evidência de resistência em situações de campo,

no entanto, o primeiro relato de falhas de formulações *Bt* no controle de pragas ocorreu nas Filipinas com a traça-das-crucíferas (*P. xylostella*). Outros relatos apontaram falhas de controle da traça das crucíferas em áreas dos EUA, Japão, América Central e China, com formulações baseadas em *B. thuringiensis*, principalmente Dipel® e Xentari® (VAN RIE & FERRÉ, 2000). Já em condições de laboratório, populações de várias espécies de lepidópteros, coleópteros e dípteros, têm desenvolvido resistência à toxina *Bt* (SCHNEPF et al. 1998; NEPPL, 2001).

A evolução da resistência a toxinas *Bt* expressas em plantas transgênicas, numa população de insetos, é afetada por um grande número de fatores que interagem entre si e são relacionados a características do material genético da planta transgênica, à bioecologia e genética da praga alvo, ao manejo da cultura e ao ambiente da região de cultivo (MAIA, 2003).

Quanto às bases bioquímicas da resistência, qualquer alteração no modo de ação das toxinas de *B. thuringiensis* poderá acarretar no desenvolvimento da resistência como, por exemplo: alteração no sítio de ligação da toxina à membrana, modificação na atividade proteolítica no intestino do inseto e aumento na velocidade de reparação do tecido epitelial danificado. No entanto a alteração no sítio de ligação da toxina à membrana é a alteração que gera os maiores níveis de resistência. Ela tem sido descrita tanto em populações resistentes capturadas em campo como em populações selecionadas artificialmente em laboratório. Esta alteração tem sido detectada em cepas resistentes a uma ou várias toxinas da família Cry1A de *P. interpunctella* (VAN RIE et al. 1990), *P. xylostella* (FERRÉ et al. 1991) e *H. virescens* (LEE et al. 1995).

Estudos de ligação das proteínas Cry têm revelado que espécies de insetos que compartilham os mesmos sítios de ligação para determinadas toxinas, ao desenvolver resistência a uma das toxinas, podem desenvolver também, resistência para o restante das toxinas que compartilham os mesmos sítios de ligação, como ocorre em *P. xylostella* (GRANERO et al. 1996; SENDRA, 2002) e *H. virescens* (JURAT-FUENTES & ADANG, 2001).

Estudos realizados por LEE et al. (2003), compararam o modo de ação da proteína Vip3A com Cry1Ab em experimentos de ativação proteolítica, ligação a BBMV "Brush Border Membrane Vesicles" e habilidade para formar poros em dois diferentes ensaios *in vitro*. Os autores verificaram que a proteína Vip3A difere-se em várias etapas, quanto ao modo de ação, utilizando um alvo molecular diferente e formando distintos canais iônicos, comparada à Cry1Ab.

Com base no trabalho realizado por SENA et al. (2009), a proteína Cry1Fa ocupa o mesmo sítio de união que Cry1Ab em *S. frugiperda*, já que esta reduziu efetivamente a união de Cry1Fa marcada à BBMV deste inseto, ao mesmo tempo em que Cry1Fa não foi deslocada pelas proteínas Vip3Af1 e Vip3Aa1, o que indica que estas toxinas ocupam um outro sítio de união em *S. frugiperda*. Sendo assim, estes resultados indicam que *S. frugiperda* apresenta um sítio de união para Cry1Fa compartilhado por Cry1Ab e outro sítio diferente compartilhado por Vip3Af1 e Vip3Aa1.

Desse modo, as toxinas Cry1Fa e Cry1Ab não devem estar numa mesma planta transgênica por permitirem a possibilidade de ocorrência de resistência cruzada. Já as propriedades distintas de união das proteínas Vip3A com proteínas Cry a receptores de *H. virescens*, *H. zea* e *S. frugiperda*, indicam um potencial muito baixo de resistência cruzada (LEE et al. 2006; JACKSON et al. 2007; SENA et al. 2009). Portanto, estas toxinas podem ser usadas em conjunto ou rotação em estratégias efetivas de controle de pragas e de manejo de resistência (JACKSON et al. 2007).

#### **2.4. Uso da técnica de PCR e sequenciamento para a seleção de novos genes de *B. thuringiensis***

Programas de isolamento vêm sendo desenvolvidos, tanto para os genes *cry* como para os genes *vip*, por meio das técnicas de PCR e sequenciamento (SELVAPANDIYAN et al. 2001; RANG et al. 2005; FANG et al. 2007; SILVA-WERNECK & ELLAR 2008; SAADAQUI et al. 2010). Com a caracterização molecular é possível discriminar os diversos isolados de *B. thuringiensis* através do conhecimento de seus padrões de comportamento e do seu genoma (FRUTOS et al. 1994).

Estes avanços na biologia molecular, baseados no DNA, permitem a diferenciação inter e intraespecífica de *B. thuringiensis*. Tais métodos podem diferenciar linhagens padrão e isolados, podendo também ser empregados na determinação da presença/ausência de certos genes (POLANCZYK & ALVES, 2003).

A identificação dos tipos e subtipos de genes contidos numa nova linhagem de *B. thuringiensis*, por meio da técnica de PCR, utilizada em diversos trabalhos como MONNERAT et al. (2007); THAMMASITTIRONG & ATTATHOM (2008); SEIFINEJAD et al. (2008); COSTA et al. (2010), pode ser empregada para prever seu potencial ao biocontrole, bem como a sua especificidade (WANG et al. 2003).

A técnica de PCR envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase. A reação de PCR se baseia no pareamento e extensão enzimática de um par de oligonucleotídeos (pequenas moléculas de DNA de fita simples) utilizados como iniciadores “primers” que delimitam a seqüência de DNA de fita dupla alvo da amplificação. Estes iniciadores são sintetizados artificialmente de maneira que suas seqüências de nucleotídeos sejam complementares a seqüências específicas que flanqueiam a região alvo (FERREIRA & GRATAPAGLIA, 1998).

Com o advento dos projetos genomas no Brasil, o sequenciamento de DNA tornou-se mais simples e com custos menores, sendo acessível a um maior número de pesquisadores. Isto encorajou a busca e seleção de novos oligonucleotídeos iniciadores, que são selecionados a partir de regiões conservadas, e permitam a amplificação de um maior número de genes, não necessariamente pertencentes a um mesmo grupo e, cujas diferenças não tenham que ser detectadas somente através do tamanho dos fragmentos obtidos após a amplificação, mas que possam ser detectadas através de sequenciamento.

Estas técnicas têm auxiliado os grupos de pesquisas na identificação e caracterização de novos genes de *B. thuringiensis*, a fim de se obter uma alternativa aos genes previamente existentes e para os quais algum nível de resistência tenha aparecido nos insetos alvos.

Neste sentido, a identificação de novos isolados de *B. thuringiensis* permite a utilização tanto na produção de bioinseticidas mais eficazes como na doação de genes para a produção de plantas transgênicas resistentes a insetos, piramidadas ou não, visando também ao manejo da resistência.

### 3. OBJETIVOS

- Selecionar, a partir de 1080 isolados de *B. thuringiensis*, provenientes de diferentes regiões brasileiras, aqueles portadores de novos genes *vip3A*, por meio da técnica de PCR.
- Obter a sequência completa de nucleotídeos do gene *vip3A*, por meio da estratégia de “primer walking”.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA), do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Câmpus de Jaboticabal, SP.

### 4.1. Linhagens e isolados de *B. thuringiensis*

Foram analisados 1.080 isolados de *B. thuringiensis* provenientes de diferentes regiões brasileiras, pertencentes ao Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA).

Além dos isolados, fizeram parte das análises três linhagens padrão, *B. thuringiensis* var. *tolworthi* HD125, *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD1, utilizadas como referência de controle positivo (lepidóptero-específico) e *B. thuringiensis* var. *tenebrionis*, como referência de controle negativo (coleóptero-específico), provenientes do Bacillus Genetics Stock Center, Columbus, Ohio.

### 4.2. Cultivo das bactérias e extração do DNA genômico

As linhagens padrão e os isolados encontram-se mantidos em culturas estoques, junto ao LGBBA. O estoque ocorre na forma de fitas de papel filtro impregnadas com uma suspensão de esporos e mantidas a 10°C. Um dia antes do plaqueamento, uma fita de papel filtro de cada isolado e das linhagens padrão de *B. thuringiensis* utilizadas foram colocadas em água estéril e a partir da suspensão de esporos, retirada uma alíquota que foi estriada em placas de Petri contendo meio BHI “Brain Heart Infusion Broth”, (12,5 g infusão de cérebro/L, 5 g infusão de coração/L, 10 g peptona/L, 2 g glicose/L, 5 g cloreto de sódio/L e 2,5 g fosfato disódico de hidrogênio/L), adicionado de ágar.



O DNA genômico foi obtido pelo método de fervura descrito por LETOWSKI et al. (2005). Primeiramente, as placas de Petri estriadas com a solução de esporos foram incubadas em estufa a 30°C por 12 h para a coleta de colônias isoladas, estas foram transferidas para tubos Falcon contendo 2 mL de meio BHI líquido e submetidas à agitação por 16 h a 200 rpm e 30°C. Após esse período, a cultura bacteriana foi então transferida para tubos de microcentrífuga de 2 mL, e centrifugadas a 17.949 xg por 3 min a 20°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 400 µL de água grau Milli-Q estéril e agitado vigorosamente em agitador do tipo “vortex”. Posteriormente, as amostras foram incubadas por 15 min em água fervente (100°C) e resfriadas por 10 min em temperatura ambiente, sendo em seguida centrifugadas a 17.949 xg por 15 min a 20°C. Após, 200 µL do sobrenadante foram transferidos para outro tubo de microcentrífuga estéril. As amostras de DNA permaneceram armazenadas a -20°C até a sua utilização.

#### **4.3. Identificação dos isolados de *B. thuringiensis* portadores de genes *vip3A* potencialmente novos**

As amostras de DNA bacteriano foram submetidas à PCR com dois pares de oligonucleotídeos iniciadores (Tabela 1), em uma única reação para identificação do gene *vip3A*. Os dois pares de iniciadores foram elaborados baseados na sequência do gene *vip3Aa1* (GenBank: [AAC37036]) para amplificar dois fragmentos do gene *vip3A* onde, segundo FANG et al. (2007), a amplificação de dois fragmentos de DNA de 463 e 365 bp, respectivamente, resulta na presença de um gene *vip3A* altamente similar ao gene *vip3Aa1*, enquanto a amplificação de apenas um fragmento de DNA, região N-terminal, resulta na presença de um provável gene *vip3A* novo, sendo esses os alvos de estudo.

Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores elaborados por FANG et al. (2007), utilizados na identificação dos isolados de *B. thuringiensis* portadores de genes *vip3A* potencialmente novos.

Iniciador	Sequência	Produto esperado (pb)
V1F	5' TTATTTTAATGGCATTATGGATTTGCC 3' (d)	463
V1R	5' GCAGGTGTAATTTTCAGTAAGTGTAGAG 3' (r)	
V2F	5' CTTCTGAAAAGTTATTAAGTCCAGAAT 3' (d)	365
V2R	5' TTA CTTAATAGAGACATCGTAAAAA 3' (r)	

(d): direto; (r): reverso

As reações de amplificação para os dois pares de oligonucleotídeos iniciadores V1F-V1R e V2F-V2R foram conduzidas em um volume de 20 µL para cada amostra e os componentes da reação e seus volumes estão descritos na Tabela 2. Em todos os lotes das reações de amplificação foi adotado um controle negativo, substituindo-se o volume de DNA usado por água grau Milli-Q estéril.

Tabela 2. Reagentes utilizados nas reações de amplificação.

Reagentes	Volume
DNA	2,0 µL
DNTP (10 mM)	0,4 µL
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	0,8 µL
Tampão para reação de PCR (10X)	2,0 µL
Oligonucleotídeo (10 pmoles)	0,5 µL
Taq DNA polimerase	1,0 U
Água (q.s.p)	20,0 µL

As reações foram transferidas para um aparelho termociclador (PTC-100 Programmable Thermal Controller – MJ Research, inc.) com circuito Hot Bonnet no qual percorreram o ciclo descrito na Tabela 3, otimizado de acordo com a temperatura de pareamento dos iniciadores.

Tabela 3. Condições de termociclagem da reação de PCR.

Passo	Temperatura	Tempo
1	94°C	2 min
2	94°C	30 s
3	53°C	45 s
4	72°C	1 min
5	30 vezes os passos	2 ao 4
6	72°C	5 min
7	5°C	Até retirada

As amostras foram visualizadas e analisadas em géis de agarose a 1,0%, utilizando-se de 10 µL do produto da PCR e 3 µL de tampão de carregamento (Tris – HCl 0,1M, pH 6,8; Azul de Bromofenol a 0,02%; Glicerol 50%). Os géis, contendo brometo de etídeo (0,5 µg/mL) foram submetidos à eletroforese horizontal a 70 V por 2 h, conduzida em tampão TEB (Tris 0,4 M, EDTA 0,1M, Ácido Bórico 0,01 M, pH 8,3), também adicionado brometo de etídeo (0,5 µg/mL). Os fragmentos amplificados foram comparados com o marcador molecular “1kb DNA ladder” (Fermentas), o qual serviu como referência de migração eletroforética para verificação dos tamanhos dos fragmentos obtidos após a reação de amplificação. Os géis de agarose foram visualizados sob fonte de luz UV e registrados por meio de um sistema de fotodocumentação digital em equipamento GEL DOC 2000 (BioRad), através do programa Quantity-One.

#### 4.3.1. Confirmação da presença de genes *vip3A* potencialmente novos nos isolados selecionados

Para uma posterior confirmação, os isolados que apresentaram amplificação apenas com o par de iniciadores V1F-V1R, tiveram seu DNA amplificado com os oligonucleotídeos iniciadores Vip5-Vip2 e Vip3-Vip6 (Tabela 4), descritos por LOGUERCIO et al. (2002) baseados nas sequência do gene *vip3Aa1* (GenBank: [AAC37036]).

Tabela 4. Oligonucleotídeos iniciadores elaborados por LOGUERCIO et al. (2002) específicos para o gene *vip3Aa*.

Iniciador	Sequência	Produto esperado (pb)
Vip5	5' ATGACCAAGAATAATACTAAATTAAGC 3' (d)	1209
Vip2	5' TCTGGGCACAATAATTTATCC 3' (r)	
Vip3	5' CAGGACATGCATTGATTGG 3' (d)	1313
Vip6	5' GATCTTACTTAATAGAGACAT 3' (r)	

(d): direto; (r): reverso

Estes oligonucleotídeos iniciadores amplificam dois fragmentos distintos no gene, sendo um fragmento de 1209 pb na região N-terminal através do uso dos iniciadores Vip5-Vip2 e um fragmento de 1313 pb na região C-terminal através do uso dos iniciadores Vip3-Vip6. E também possibilitam a amplificação do gene *vip3Aa* completo, partindo do “start códon” até o “stop codon” utilizando-se como par de iniciadores Vip5 e Vip6.

#### 4.4. Sequenciamento do fragmento N-terminal dos genes *vip3A* potencialmente novos

Após a amplificação dos fragmentos por PCR e sua posterior confirmação através da corrida eletroforética, o isolado que apresentou amplificação com o uso dos iniciadores Vip5-Vip2 (fragmento N-terminal), teve seu produto quantificado em espectrofotômetro, medindo-se a absorvância nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm sendo a relação 260/280 nm calculada (SAMBROOK & RUSSEL, 2001).

As amostras foram diluídas a uma concentração de 50 ng/μL e submetidas a um sequenciamento prévio utilizando como iniciador direto o oligonucleotídeo Vip5. As reações de sequenciamento foram conduzidas com o corante “DYEnamic™ ET Dye Terminator Kit (MegaBACE™)” conforme descrita na Tabela 5. Já o programa de termociclagem utilizado seguiu as condições descritas na Tabela 6.

Tabela 5. Reagentes utilizados nas reações de sequenciamento.

Reagentes	Volume
DNA (50 ng/ $\mu$ L)	2,0 $\mu$ L
Tampão (2,5X)	3,0 $\mu$ L
Oligonucleotídeo (10 pMol)	1,0 $\mu$ L
Dyynamic	1,0 $\mu$ L
Água (q.s.p)	10,0 $\mu$ L

Tabela 6. Condições de termociclagem utilizada nas reações de sequenciamento.

Passo	Temperatura	Tempo
1	94°C	20 s
2	50°C	15 s
3	60°C	2 mim
4	40 vezes os passos 1 ao 3	
5	5°C	Até retirada

Após a retirada das amostras do termociclador, as mesmas passaram por um processo de precipitação do DNA, utilizando EDTA/Etanol/Acetato de Sódio, seguindo as recomendações da Empresa *Applied Biosystem* que consistiu em: adicionar 1  $\mu$ L de EDTA 125 mM, 1  $\mu$ L de Acetato de Sódio 3M e 25  $\mu$ L de Etanol 100%. As amostras foram rapidamente homogenizadas em aparelho tipo “vortex” e incubadas 15 min a temperatura ambiente, fora do alcance da luz. Decorrente esse período, as amostras foram submetidas à centrifugação por 30 min a 1.699 xg, em uma temperatura de 4°C. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente e adicionou-se, 35  $\mu$ L de etanol 70%, seguido de uma centrifugação nas mesmas condições por 15 min. Novamente o sobrenadante foi cuidadosamente descartado e uma rápida centrifugação adicional foi realizada, dessa vez, com a placa invertida sobre papel filtro para a total retirada do etanol. A placa permaneceu em fluxo laminar desprovido de luz por aproximadamente 30 min para completa secagem.

Adicionou-se 10  $\mu$ L de HiDi Formamida (*Applied Biosystems*) em cada amostra, estas foram desnaturadas em termociclador a 95°C por 5 min e imediatamente

resfriadas em gelo para serem sequenciadas utilizando-se do analisador automático de DNA modelo 3100 *Genetic Analyzer* ABI, da empresa *Applied Biosystems*.

#### 4.5. Análise dos dados gerados por sequenciamento

Ferramentas de bioinformática foram utilizadas em todas as análises dos dados gerados. Os arquivos dos cromatogramas resultantes dos sequenciamentos foram submetidos à análise de qualidade para pontuação de cada base lida “base calling”, montagem do fragmento através de alinhamento das sequências com qualidade e visualização gráfica da montagem resultante utilizando-se do pacote de programa Phred/Phrap/Consed (EWING & GREEN, 1998; EWING et al. 1998; GORDON et al. 1998), em um computador tipo servidor “Dell PowerEdge 2900”, sistema operacional “Linux RedHat Enterprise 4.0”.

Para que a sequência consenso fosse aceita, foi definido que todas as bases deveriam ter no mínimo qualidade *phred*  $\geq 40$ , o que corresponde a uma precisão igual ou menor do que 1 erro a cada 10.000 pb (acurácia de 99,99%). As sequências FASTA resultantes foram comparadas 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>).

#### 4.6. Obtenção dos genes *vip3A* completos

Com base nos melhores “hits” dos resultados de comparação das sequências, um oligonucleotídeo reverso foi sintetizado na tentativa de se amplificar o gene *vip3A* completo do isolado de *B. thuringiensis*.

Este oligonucleotídeo foi sintetizado com base na sequência do gene *vip3Ab2* (GenBank: [AAY88247.1]), recebendo a denominação de V3Ab(r) 5' TTA CTTAATTGAAAATCTCGGAAATT 3', e para a amplificação do gene completo, utilizou-se como iniciador direto o oligonucleotídeo Vip5, que contém o códon de iniciação ATG (Tabela 4).

A reação de amplificação foi conduzida conforme descrito na Tabela 2 e o programa de termociclagem seguiu as condições descritas na Tabela 7.

Tabela 7. Condições de termociclagem utilizada nas reações de amplificação do gene *vip3A* completo do isolado de *B. thuringiensis*.

Passo	Temperatura	Tempo
1	94°C	2 min
2	94°C	1 min
3	47°C	1 min
4	72°C	2 min
5	30 vezes os passos	2 ao 4
6	72°C	5 min
7	5°C	Até retirada

Para as linhagens padrão de *B. thuringiensis* var. HD1 e HD125, a amplificação do gene *vip3A* completa foi obtida com os iniciadores Vip5-Vip6 seguindo as condições de amplificação e termociclagem descritas nas Tabelas 2 e 3, respectivamente.

Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,0% conforme descrito por SAMBROOK & RUSSEL (2001).

#### 4.7. Clonagem dos genes *vip3A* completos

O produto amplificado referente ao gene *vip3A* completo, a partir do DNA do isolado e das linhagens padrão, com cerca de 2370 pb, foi clonado no vetor pGEM-T Easy (Promega, Madison, USA) de acordo com as indicações do fabricante.

Células de *E. coli* DH10B foram usadas para a transformação por meio do método de choque térmico e selecionadas em placas de LB (10 g de tripton/L, 5 g de extrato de levedura/L e 5 g de NaCl/L, adicionada de ágar), contendo 100 µg ampicilina/mL, 20 mg X-Gal/mL e 200 mg IPTG/mL (SAMBROOK & RUSSEL, 2001).

Os clones transformantes (colônias brancas) foram selecionados e transferidos, de forma organizada, para tubos de ensaio contendo 3 mL de meio de cultura LB líquido suplementado com ampicilina e as células foram multiplicadas a 37°C por 12 h sob

agitação constante de 110 rpm. Posteriormente, uma alíquota de 700 µL foi asepticamente estocada em glicerol (100%) estéril e armazenada em ultra-freezer a -80° C.

Após o período de multiplicação das células descrito anteriormente, 2 mL das células foram utilizadas para a extração do DNA plasmidial. A solução de células foi centrifugada por 5 min a 17.949 xg e o sobrenadante foi descartado, 200 µL da solução I (25 mM de Tris-HCl pH 8,0, 10 mM de EDTA, 50 mM de D-glicose), previamente resfriados, foram adicionados às amostras, agitados até a completa solubilização das células e mantidos a temperatura ambiente por 5 min.

Em seguida, 200 µL da solução II (0,2 N de NaOH, 1% de SDS), foram adicionados às amostras. A solução foi gentilmente misturada por meio da inversão dos tubos e mantida no gelo por 5 min. Decorrido este período, 150 µL da solução III (3 M de Acetato de Potássio, 2 M de Ácido Acético) foram acrescentados à solução. Os tubos foram gentilmente invertidos a fim de misturar a solução e mantidos no gelo por 5 min. Após este período, as amostras foram submetidas a 5 min de centrifugação.

O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e 500 µL de cloroformio /álcool isoamílico (24:1) foram adicionados à suspensão. Após 2 min de homogeneização, procedeu-se à centrifugação das amostras por 5 min a 17.949 xg. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo. O DNA foi precipitado por meio da adição de 875 µL de etanol absoluto à solução. As amostras foram misturadas e mantidas no gelo por 5 min. Logo em seguida, as mesmas foram centrifugadas por 5 min e o sobrenadante foi descartado. O precipitado de DNA foi lavado com 1 mL de etanol 70%, secado sob vácuo e ressuspenso em 30 µL de TE (Tris HCl 10 mM pH 8,0 e EDTA 0,1 M pH 8,0) contendo RNase (10 µg/mL).

Os clones transformantes foram verificados por PCR através da amplificação do fragmento de interesse com os oligonucleotídeos T7 e SP6, do vetor de clonagem seguindo as condições de reação e termociclagem conforme descrito nas Tabelas 8 e 9, respectivamente.



Tabela 8. Reagentes utilizados nas reações de amplificação dos clones positivos.

Reagentes	Volume
DNA	0,5 µL
DNTP (10 mM)	0,5 µL
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	0,75 µL
Tampão para reação de PCR	2,5 µL
Ôligonucleotídeo (10 pmoles)	1,25 µL
Taq DNA polimerase	1,0 U
Água (q.s.p)	25,0 µL

Tabela 9. Condições de termociclagem utilizada para amplificação dos clones positivos.

Passo	Temperatura	Tempo
1	95°C	2 min
2	95°C	45 s
3	48°C	30 s
4	72°C	2 min
5	40 vezes os passos	2 ao 4
6	72°C	10 min
7	5°C	Até retirada

Os produtos da amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,0% conforme descrito por SAMBROOK & RUSSEL (2001).

#### 4.8. Sequenciamento dos genes *vip3A* completos por meio da estratégia de “primer walking”

Com o objetivo de se obter o gene *vip3A* completo a partir do isolado de *B. thuringiensis* e das duas linhagens padrão (HD1 e HD125), inicialmente amostras de DNA plasmidial foram utilizadas como molde em duas reações de sequenciamento: uma utilizando o iniciador universal T7 e outra utilizando o iniciador universal SP6, a fim de se obter as extremidade 5' e 3' dos genes *vip3A* em estudo. As reações de sequenciamento e termociclagem seguiram as condições descritas nas Tabelas 5 e 6, respectivamente.

Partindo-se da sequência consenso das amostras, foram elaborados quatro oligonucleotídeos internos para ambas as linhagens padrão e cinco oligonucleotídeos para o isolado (Tabela 10) utilizando-se do programa GeneRunner 3.0 (*Hasting Software Inc*). Além destes, também foram utilizados para o sequenciamento os oligonucleotídeos usados nas reações de amplificação (Tabelas 1 e 4), possibilitando, desta forma, ir obtendo as sequências dos genes *vip3A* até o códon de terminação das mesmas.

As sequências consenso, resultantes desta estratégia, foram utilizadas para alinhamento com outras sequências previamente conhecidas e disponíveis no banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

Tabela 10. Oligonucleotídeos iniciadores elaborados na estratégia “primer walking” para a obtenção dos genes *vip3A* completos.

Iniciador	Sequência	Posição nos genes
Linhagens Padrão (HD1 e HD125)		
A1(d)	5'CTCTATGTTGAGTGATGTAATG 3'	367 - 388
A2(r)	5' TCCGACCTCACTGCCACTTG 3'	808 - 789
A3(d)	5' TAAGTGCTAATGATGATGG 3'	1401 - 1419
A4(r)	5' TGATCCCGTACTCGTCC 3'	2070 - 2054
Isolado de <i>B. thuringiensis</i>		
B1(d)	5' ATTTCCGACAAGTTAGATG 3'	446 - 464
B2(r)	5' TTTCTACCATTACATCG 3'	723 - 706
B3(d)	5' AAACCAGGATATGCTTTG 3'	1056 - 1073
B4(d)	5' GATAAATTCAGATGCTTG G 3'	2035 - 2053
B5(r)	5' AGTGAGTGAATTCCTGA G 3'	2095 - 2077

(d): direto; (r): reverso

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Identificação dos isolados de *B. thuringiensis* portadores de genes *vip3A* potencialmente novos

A seleção dos isolados de *B. thuringiensis* portadores de genes *vip3A* potencialmente novos foi realizada utilizando-se dos pares de iniciadores V1F-V1R e V2F-V2R (Tabela 1) conforme descritos por FANG et al. (2007). Segundo o autor, os isolados que apresentam amplificação para os dois pares de iniciadores, gerando fragmentos de 463 pb e 365 pb, são portadores de genes *vip3A* pertencentes à subclasse *vip3Aa*, sendo que estes iniciadores foram elaborados com base na sequência do gene *vip3Aa1*. Já a amplificação de apenas um fragmento, de 463 pb, referente ao par de iniciadores V1F-V1R, caracteriza os isolados como portadores de genes *vip3A* novos, visto que esta região é bem conservada entre os genes *vip3A* descritos e a região amplificada pelos iniciadores V2F-V2R, de 365 pb, é muito menos conservada (RANG et al. 2005), sendo sua ausência um indicativo de que os isolados apresentam genes *vip3A* não pertencentes à subclasse *vip3Aa*.

Através da análise virtual gerada pelo programa pDRAW32 (<http://www.acaclone.com>) pode-se observar na Figura 1 as regiões representando os respectivos sítios de pareamento dos oligonucleotídeos iniciadores V1F-V1R e V2F-V2R.

Para verificar a presença ou ausência dessas regiões do gene *vip3A* nas amostras de *B. thuringiensis* foram realizadas reações de amplificação (Tabelas 2 e 3) com os pares de iniciadores (Tabela 1) e o DNA extraído de cada amostra, essas reações foram conduzidas em triplicatas. Como controle positivo, em todos os experimentos, utilizou-se das linhagens padrão de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD1 e *B. thuringiensis* var. *tolworthi* HD125 e como controle negativo, da linhagem *B. thuringiensis* var. *tenebrionis*.

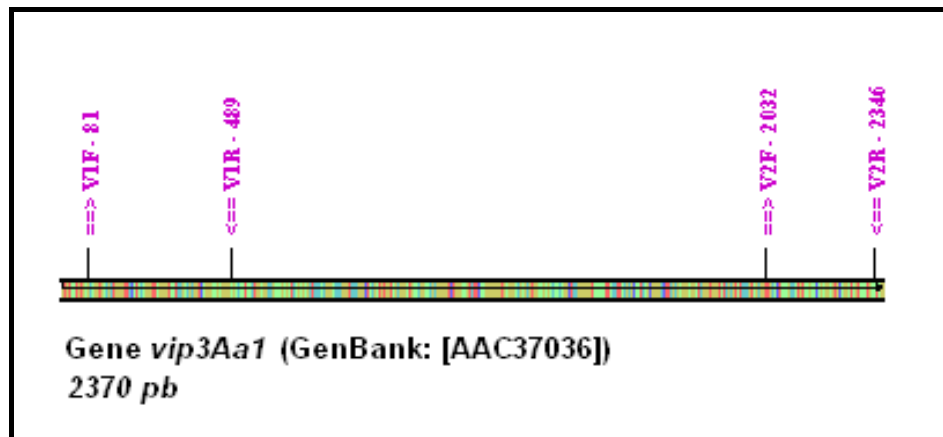


Figura 1. Análise virtual gerada pelo programa pDRAW32 indicando os sítios de pareamento dos oligonucleotídeos iniciadores V1F-V1R e V2F-V2R elaborados por FANG et al. (2007), com base na sequência do gene *vip3Aa1*.

Dos 1080 isolados utilizados nesse estudo, 60 isolados (5,5%) apresentaram amplificação para os dois pares de iniciadores, V1F-V1R e V2F-V2R, indicando a presença de um gene *vip3A* altamente similar à subclasse *vip3Aa* e 52 isolados (4,8%), apresentaram amplificação apenas para um par de iniciadores, V1F-V1R, indicando a presença de um gene *vip3A* potencialmente novo, não pertencente à subclasse *vip3Aa*.

Através do uso dos oligonucleotídeos para o gene *vip3A*, foi possível identificar, na coleção de isolados pertencente ao LGBBA, 112 isolados (10,3%) pertencentes à classe *vip3A*, já em estudos realizados por ESTRUCH et al. (1996) genes pertencentes a esta classe foram encontrados em aproximadamente 15% dos isolados analisados e em 23% dos isolados analisados por RICE et al. (1999).

Em trabalho realizado por FANG et al. (2007), com os mesmos oligonucleotídeos iniciadores, foi encontrado um isolado de *B. thuringiensis* portador de um gene *vip3A* significativamente diferente do gene *vip3Aa1*, este gene foi sequenciado e demonstrou ser idêntico ao gene descrito por NARVA & MERLO (patente 20040128716), o qual foi clonado e nomeado como *vip3Ac1*, de acordo com o sistema de nomenclatura das toxinas Vip (CRICKMORE et al. 2010).

A proteína Vip3Ac1 possui uma similaridade de 85% de sua sequência de aminoácidos com proteína Vip3Aa1, porém, esta não está uniformemente distribuída em todo o comprimento da proteína, uma vez que na região N-terminal os resíduos de

aminoácidos da Vip3Ac1 estão altamente conservados possuindo uma similaridade de 94% com a proteína Vip3Aa1, enquanto que na região C-terminal esses resíduos de aminoácidos estão muito menos conservados, exibindo apenas 51% de similaridade com a sequência da proteína Vip3Aa1.

Sendo assim, os 52 isolados selecionados neste estudo como portadores de genes *vip3A* novos, poderiam ser classificados como pertencentes às subclasses distintas da *vip3Aa* devido a alterações em suas sequências de aminoácidos na região C-terminal do gene, que é a responsável na diferenciação das subclasses do gene *vip3A*.

Na Figura 2 estão demonstrados os perfis dos DNAs amplificados, onde podem ser observados os produtos das amplificações como bandas com os tamanhos esperados de 463 pb para o par de iniciadores V1F-V1R e de 365 pb para o par de iniciadores V2F-V2R.

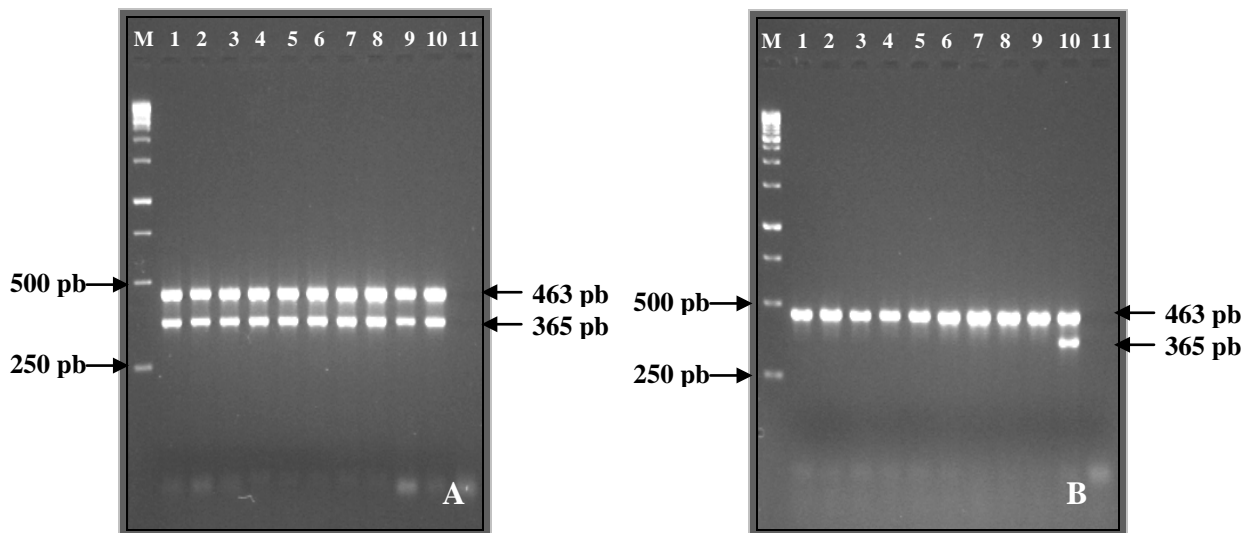


Figura 2. Eletroforograma evidenciando a amplificação das regiões V1F-V1R e V2F-V2R do gene *vip3A* nas amostras de *B. thuringiensis*. **A** - MM: Marcador Molecular 1Kb DNA Ladder; 1 a 8: Isolados de *B. thuringiensis* portadores das regiões V1F-V1R e V2F-V2R do gene *vip3Aa*; 9: Controle Positivo – *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD1; 10: Controle Positivo – *B. thuringiensis* var. *tolworthi* HD125; 11: Controle Negativo – *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* (coleóptero – específico). **B** - MM: Marcador Molecular 1Kb DNA Ladder; 1 a 9: Isolados de *B. thuringiensis* portadores das regiões V1F-V1R; 10: Controle Positivo – *B. thuringiensis* var. HD125; CN: Controle Negativo – *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* (coleóptero – específico).

### 5.1.1. Confirmação da presença de genes *vip3A* potencialmente novos nos isolados selecionados

Para uma posterior confirmação, os 52 isolados que apresentaram apenas a região V1F-V1R do gene, tiveram seu DNA amplificado com os iniciadores Vip5-Vip2 e Vip3-Vip6 (Tabela 4), descritos por LOGUERCIO et al. (2002). Esses iniciadores foram desenhados baseados na sequência do gene *vip3Aa1* (GenBank: [AAC37036]), porém como podemos observar na análise virtual gerada pelo programa pDRAW32 (Figura 3), estes oligonucleotídeos iniciadores amplificam dois fragmentos distintos no gene, sendo um fragmento de 1209 pb na região N-terminal através do uso dos iniciadores Vip5-Vip2 e um fragmento de 1313 pb na região C-terminal através do uso dos iniciadores Vip3-Vip6.

Estas regiões de pareamento dos oligonucleotídeos se diferem das regiões amplificadas pelos oligonucleotídeos citados anteriormente e também possibilitam a amplificação do gene *vip3Aa* completo, partindo do “start códon” até o “stop codon” utilizando-se como par de iniciadores Vip5 e Vip6.

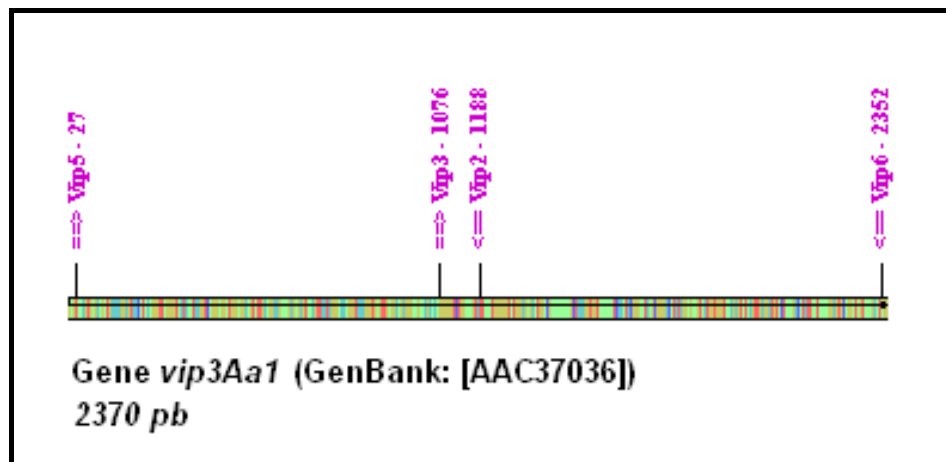


Figura 3. Análise virtual gerada pelo programa pDRAW32 indicando os sítios de pareamento dos oligonucleotídeos iniciadores Vip5-Vip2 e Vip3-Vip6 elaborados por LOGUERCIO et al. (2002), com base na sequência do gene *vip3Aa1*.

Com o uso do par de iniciadores Vip5-Vip2 foi possível amplificar a região N-terminal de um dos isolados, o qual foi denominado I187, gerando um fragmento de 1209 pb, contendo o códon ATG inicial (Figura 4).

Já as linhagens padrão apresentaram amplificação para os iniciadores Vip5-Vip2 (Figura 4) e Vip3-Vip6, demonstrando serem estas pertencentes à subclasse vip3Aa.

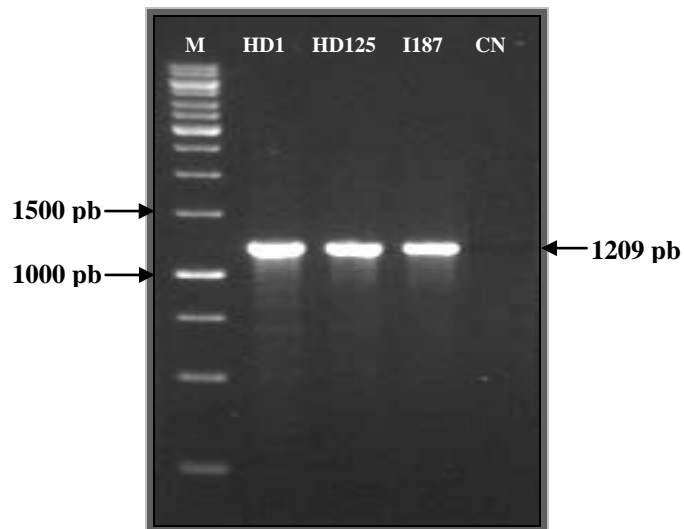


Figura 4. Eletroforograma evidenciando a amplificação da região Vip5-Vip2 do gene *vip3A* nas amostras de *B. thuringiensis*. M: Marcador Molecular 1Kb DNA Ladder; HD1: Linhagem Padrão *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD1 (Controle positivo); HD125 Linhagem Padrão *B. thuringiensis* var. *tolworthi* HD125 (Controle positivo); I187: Isolado I187 de *B. thuringiensis*; CN: Linhagem Padrão *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* (Controle negativo).

## 5.2. Sequenciamento do fragmento N-terminal do isolado I187

O produto amplificado de 1209 pb referente ao gene *vip3A* do isolado I187 amplificado a partir da combinação dos iniciadores Vip5-Vip2 (região N-terminal) foi inicialmente sequenciado utilizando-se como iniciador direto o oligonucleotídeo Vip5 (Tabela 4).

Este sequenciamento permitiu, por meio da análise por BLAST, verificar a similaridade desta região com aquelas depositadas no banco de dados GenBank.

Verificou-se a ocorrência de 69% de similaridade com o gene *vip3Aa* (GenBank [ABB72459.1]) e 68% de similaridade com o gene *vip3Ab2* (GenBank [AAAY88247.1]), além de similaridade com outras proteínas Vip3, que embora tivessem as sequências depositadas no banco de dados de proteínas na página do NCBI, não apresentavam-se classificadas em nenhuma subclasse dos genes *vip3A* segundo as regras de nomenclatura para *B. thuringiensis*.

A similaridade encontrada com genes da subclasse *vip3Aa* pode ter ocorrido pelo fato de ter sido realizado o sequenciamento apenas do fragmento referente à região conservada (N-terminal) do gene, que é muito similar em todas as subclasses do gene *vip3A* (RANG et al. 2005).

### **5.3. Amplificação do gene *vip3A* completo do isolado I187 de *B. thuringiensis* e das linhagens padrão**

Com base na sequência do gene *vip3Ab2*, elaborou-se então, um iniciador reverso, denominado V3Ab, na tentativa de se conseguir amplificar o gene *vip3A* completo do isolado I187, julgando ser este um gene pertencente à subclasse *vip3Ab*.

Utilizando-se da combinação de iniciadores Vip5-V3Ab, foi possível a obtenção de um fragmento de 2370 pb, evidenciando a presença do gene *vip3A* completo no isolado I187 (Figura 5). Dado o interesse em se obter genes *vip3A* isolados e clonados para futura expressão em linhagens de *E. coli* recombinantes, buscou-se também, a amplificação e a caracterização dos genes *vip3A* completos das linhagens padrão HD1 e HD125, utilizadas como controle positivo nos experimentos.

Ambas as linhagens, não só apresentaram os produtos de amplificação de 463 pb (V1F-V1R) e de 365 pb (V2F-V2R), o que as caracteriza como portadoras de genes pertencentes à subclasse *vip3Aa*, segundo FANG et al. (2007), como também, apresentaram a amplificação de fragmentos contendo em torno de 2370 pb, referentes ao gene *vip3Aa* completo (Figura 5), quando foram utilizados os iniciadores Vip5-Vip6 (Tabela 4), específicos para tal subclasse, segundo LOGUERCIO et al. (2002).



No entanto, apesar das linhagens padrão terem apresentado genes *vip3* pertencentes à subclasse *vip3Aa*, através do uso dos oligonucleotídeos, estes por sua vez poderiam apresentar substituições em sua sequência de aminoácidos de modo a serem classificados como genes *vip3Aa* diferentes dos que estão descritos e agrupados no banco de dados de *Bacillus thuringiensis* (CRICKMORE et al. 2010).

A linhagem padrão de *B. thuringiensis* var. *tenebrionis*, utilizada como controle negativo, não apresentou amplificação para os iniciadores em questão, indicando a ausência de genes *vip3A* na mesma, caracterizada como coleóptera específica.

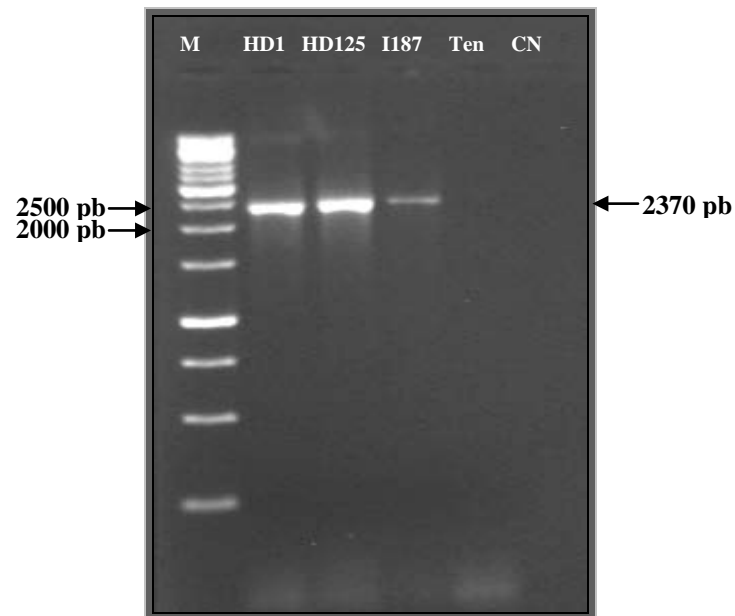


Figura 5. Eletroforograma evidenciando a amplificação do gene *vip3A* completo nas amostras de *B. thuringiensis*. M - Marcador Molecular 1Kb DNA Ladder; HD1 - Linhagem Padrão *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD1 (Controle positivo); HD125 - Linhagem Padrão *B. thuringiensis* var. *tolworthi* HD125 (Controle positivo); I187 - Isolado I187 de *B. thuringiensis*; Ten - Linhagem Padrão *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* (Controle negativo); CN – Controle negativo da reação (Água).

#### 5.4. Clonagem dos genes *vip3A* completos

Os genes *vip3A* completos do isolado I187 e das linhagens padrão (HD1 e HD125) foram clonados no vetor pGEM-T Easy conforme a recomendação do

fabricante. A confirmação dos clones positivos foi realizada através da amplificação do fragmento de interesse com os oligonucleotídeos T7 e SP6 (Tabelas 8 e 9).

Foram considerados como positivos e utilizados nas reações de sequenciamento, apenas os clones que apresentaram a amplificação do tamanho de, aproximadamente, 2570 pb (Figura 6), isto porque os oligonucleotídeos T7 e SP6 foram elaborados baseados na sequência de uma região do vetor de clonagem, e desta forma, através da amplificação, uma parte adicional deste vetor é amplificada, devendo esta ser considerada e adicionada ao tamanho esperado do gene *vip3A* que é de aproximadamente 2370 pb.

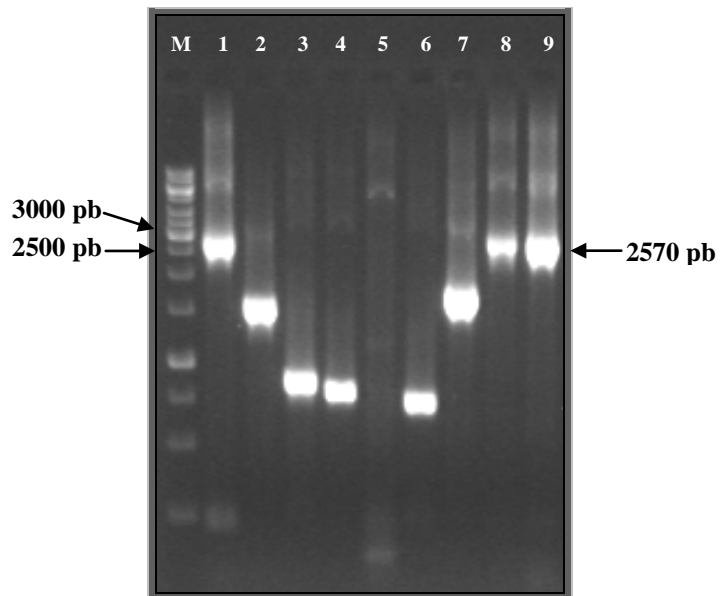


Figura 6. Eletroforograma evidenciando a confirmação dos clones positivos através da amplificação com os oligonucleotídeos T7 e SP6. M - Marcador Molecular 1Kb DNA Ladder; 1, 8 e 9 - Clones positivos com tamanho esperado de 2570 pb; 2 a 7 - Clones negativos.

Os clones positivos foram submetidos ao sequenciamento das extremidades com os oligonucleotídeos universais T7 e SP6, seguindo as condições de reação e termociclagem descrita na Tabela 5 e 6, respectivamente. A partir destas sequências,

foram elaborados iniciadores internos nos genes a fim de se obter a sequência completa dos mesmos.

Estes iniciadores foram utilizados em reações de sequenciamento conforme descrito na Tabela 5, sempre utilizando como molde o DNA plasmidial dos clones positivos. Já a termociclagem seguiu as condições descritas na Tabela 6, alterando-se apenas a temperatura de pareamento dos oligonucleotídeos, de acordo com a temperatura específica descrita na bula do oligonucleotídeo adquirido.

### **5.5. Análise das sequências completas dos genes *vip3A***

Após a montagem dos genes completos através das ferramentas de bioinformática citadas no item 4.5., as sequências consenso resultantes foram comparadas com os bancos de dados não redundantes de proteínas do NCBI, através do algoritmo BLASTX da ferramenta BLAST, assim como também, com as proteínas Vip3A já identificadas e catalogadas no banco de dados de *B. thuringiensis* ([http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil\\_Crickmore/Bt/](http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/)), de acordo com as semelhanças genéticas existentes entre elas.

#### **5.5.1. Análise do gene *vip3Aa* da linhagem padrão *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD1**

As análises permitiram verificar que para a linhagem padrão *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD1, a sequência consenso para o gene *vip3Aa* apresentou 2370 bases com qualidade *phred* média de 79.6 por base, o que corresponde a uma probabilidade de erro menor que 0,00001% e 789 aminoácidos (Figura 7).

Esta sequência foi primeiramente enviada ao banco de dados GenBank recebendo o número de acesso (GenBank: [HQ594534]) e posteriormente, enviada ao banco de dados *Bacillus thuringiensis*: Toxin Nomenclature ([http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil\\_Crickmore/Bt/](http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/)) no qual foi classificada e agrupada recebendo a nomenclatura de gene *vip3Aa43*.

Utilizando o algoritmo BLASTX, da ferramenta BLAST (ALTSCHUL et al. 1990), disponível publicamente no site do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), foram feitas comparações da sequência do gene *vip3Aa43*, contra o banco de dados de proteínas do NCBI do dia 19 de setembro de 2010.

Verificou-se que a sequência de aminoácidos apresenta 100% de similaridade com o acesso (GenBank: [AAN60738.1]) (Figura 8). Este acesso representa a sequência da proteína Vip3Aa10, e encontra-se agrupado com mais 13 sequências de genes *vip3Aa* cujos números de acesso são os seguintes: Vip3Aa7 – gb[AAK95326.1], Vip3Aa – gb[AAL69543.1], Vip3Aa - gb[AAL69544.1], Vip3Aa15 – gb[AAP51131.1], Vip3Aa – gb[AAM22456.2], Vip3Aa11 – gb[AAR36859.1], Vip3Aa21 – gb[ABD84410.1], Vip3Aa – gb[ABF54929.1], Vip3Aa – gb[ABV03359.1], Vip3Aa33 – gb[ACY38212.1], Vip3Aa34 – gb[ACY38213.1], Vip3Aa36 – gb[ADF43020.1] e Vip3Aa37 – gb[ADJ18213.1].

1	<b>atgaacaagaataactaactaattaagc</b> acaagagccttaccaagt	1216	gaacaaatctattatacaataacatagattttccaaatgaatat
	<b>M N K N N T K L S T R A L P S</b>	1261	gtaattactaaaattgatttctactaaaaaatgaaaactttaaga
46	tttattgattatittttaattggcattttatggatttgccactggatc		V I T K I D F T K K M K T L R
	<b>F I D Y F N G I Y G F A T G I</b>	1306	tatgaggtaacagcgaatttttatgattcttctacaggagaaatt
91	aaagacattatgaacatgatttttaaaacggatcacaggtggat		<b>Y E V T A N F Y D S S T G E I</b>
	<b>K D I M N M I F K T D T G G D</b>	1351	gacttaaaataagaaaaagtagaatcaagtgaagcgggagataga
136	ctaaccctagacgaaattttaagaatcagcagttactaaatgat		<b>D L N K K K V E S S E A E Y R</b>
	<b>L T L D E I L K N Q Q L L N D</b>	1396	acgt <b>taagtgctaataatgatgatgg</b> gggtgatatgccgttaggtgc
181	atttctggtaaatggatggggtgaatggaagcctaaatgatcct		<b>T L S A N D D G V Y M P L G V</b>
	<b>I S G K L D G V N G S L N D L</b>	1441	atcagtgaacatttttgactccgattaatgggttggcctccaa
226	atcgcacagggaaacttaatacagaattatctaaaggaatatta		<b>I S E T F L T P I N G F G L Q</b>
	<b>I A Q G N L N T E L S K E I L</b>	1486	gctgatgaaaattcaagataattactttaacatgtaaatcatat
271	aaaattgcaaatgaacaaaatcaagtttttaaatgatgtaataac		<b>K E I V N S R L I F T L T C K G E I</b>
	<b>K I A N E Q N Q V L N D Y N D</b>	1531	ttaagagaactactgctagcaacagacttaagcaataaagaaact
316	aaactcgatgcgataaatacagatgcttcgggtatattctacctaaa		<b>L R E L L L A T D L S N K E T</b>
	<b>K L D A I N T M L R V Y L P K</b>	1576	aaattgatcgctcccgcaagtggttttattagcaaatattgtagag
361	attac <b>ctctatggtgagtgatgtaatg</b> aaacaaaattatgctgcta		<b>A D E I V P P S G F T L S N I Y E</b>
	<b>I T S M L S D V M K Q N D Y N D</b>	1621	aacgggtccatagaagaggacaatttttagagccgtggaagcaaat
406	agctcgcaaatagaataacttaagtaacaattgcaagagatttct		<b>N G S I E E D N L E P W K A N</b>
	<b>S L Q I E Y L S K Q L Q E I S</b>	1666	aataagaatgcgatgtagatcacaagcgggagtgtaattggaact
451	gataagttggatatttataatgtaaatgtactattat <b>ctctaca</b>		<b>N K N A Y V D H T G G V N G T</b>
	<b>D K L D I I N V N V L I N S T</b>	1711	aaagctttatgattcataaggcagggaatttcacaatttatt
496	<b>cttactgaaattacactg</b> ctatcaaaggattaaatattgtgtaac		<b>K A L Y V H K D G G I S Q F I</b>
	<b>L T E I T P A Y Q R I K Y V N</b>	1756	ggagataagttaaaaccgaaaactgagatgtaatccaatatact
541	gaaaaatttgaggaattacttttggctacagaaactagttcaaaa		<b>G D E K L K P K T E Y V I Q Y T</b>
	<b>E K F E E L T F A T E T S N K</b>	1801	gttaaaggaaaacctctattcattttaaagatgaaaactactgga
586	gtaaaaaggatggctctcctgcagatattcctgatgagttact		<b>V K G K P S I H L K D E N T G</b>
	<b>V K K D G S P A D I L D E L T</b>	1846	tatattcattatgaagatacaataataatttagaagattatcaa
631	gagtttaactgaactagcgaagtgtaacaaaaaatgatgtggat		<b>Y I H Y E D T T N N N L E D Y Q</b>
	<b>E L T E A L K S V T K N D V D</b>	1891	actattaataaacgtdttactnacagactgtttaaagggagtg
676	ggttttgaaattttaccttaatacattccacgatgtaattggtagga		<b>T I N K R F T T G T D L K G V</b>
	<b>G F E F Y L N T F H D V M V G</b>	1936	tatttaatttttaaaaagtcaaaatggagatgaagcctggggagat
721	aataatattatcgggcttcagcttttaaaaactgcacatcggaatta		<b>Y L I L K S Q N G D E A W G D</b>
	<b>N N L F G R S A L K T A S E L</b>	1981	aactttattatgttgaaattagtc <b>cttctgaaaagtattaaagt</b>
766	attactaaagaaaatgtgaaaa <b>caagtgccagtgaggtcgga</b> aat		<b>N F I I L E I S P S E K L L S</b>
	<b>I T K E N V K T S G S E V G N</b>	2026	<b>ccagaat</b> taattaatacaataaatt <b>ggacgagtacgggatca</b> act
811	gtttataacttcttaattgtattaacagctctgcaagcaaaagct		<b>P E L I N T N N W T S T G S T</b>
	<b>V Y N F L I V L T A L Q A K A</b>	2071	aatattacgggtaataacactcactctttatcaggggagcagagg
856	ttcttactttaacaacatgccgaaaatttattaggcttagcagat		<b>N I S G N T L T L Y Q G G R G</b>
	<b>F L T L T T C R K L L G L A D</b>	2116	attctaaacaacacctcaattagatagttttcaacttataga
901	attgattatacttctattatgaatgaacatttaataaaggaaaaa		<b>I L K Q N L Q L D S F S T Y R</b>
	<b>I D Y T S I M N E H L N K E K</b>	2161	gtgtatttttctgtgctcggagatgctaattgaaggattagaatt
946	gaggaatttagagtaaacatcctcctacacttctaataactttt		<b>V Y F S V S G D A N V R I R N</b>
	<b>E E F R V N I L P T L S N T F</b>	2206	tctagggaggtgttatttgaaaaagatatatgagcgggtgctaaa
991	tctaactcctaattatgcaaaagttaaggaagtgatgaagatgca		<b>S R E V L F E K R Y M S G A K</b>
	<b>S N P N Y A K V K G S D E D A</b>	2251	gatgtttctgaaatgttcactacaaaaatttgagaaagataacttt
1036	aagatgattgtggaagctaaac <b>caggacatgcattgattgg</b> gttt		<b>D V S E M F T T K F E K D N F</b>
	<b>K M I V E A K P G H A L I G F</b>	2296	tatatagagcttctcaagggataaatttatatgggtggtcctatt
1081	gaaattagtaattgattcaattacagattaaaagtatatgaggct		<b>Y I E L S Q G N N L Y G G P I</b>
	<b>E I S N D S I T V L K V Y E A</b>	2341	gtaca <b>ttttacgatgctctattaagtaa</b> 2370
1126	aagctaaaacaaaattatcaagtcgataaggattccttatcggaa		<b>V H F Y D V S I K *</b>
	<b>K L K Q N Y Q V D K D S L S E</b>		
1171	gttatttatggatgat <b>ggataaattattgtgccaga</b> tcaatct		
	<b>V I Y G D M D K L L C P D Q S</b>		

Figura 7. Sequência de nucleotídeos e deduzida de aminoácidos do gene *vip3Aa43* (GenBank: [HQ594534]) obtido a partir da linhagem padrão *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD1. A metionina inicial e o códon de parada estão representados em negrito e em destaque estão os oligonucleotídeos utilizados na estratégia de “primer walking”, onde em verde estão os oligonucleotídeos direto e em amarelo os oligonucleotídeos reverso.

Sequences producing significant alignments:						
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
<a href="#">AAN60738.1</a>	vegetative insecticidal protein Vip3V [Bacillus thuringiensis] >qb AA	<a href="#">1496</a>	1496	99%	0.0	100%
<a href="#">AAW65132.1</a>	vegetative insecticidal protein [Bacillus thuringiensis]	<a href="#">1495</a>	1495	99%	0.0	99%
<a href="#">AAC37036.1</a>	vip3A(a) [Bacillus thuringiensis] >qb AAO23140.2  VIP3AI [syntheti	<a href="#">1494</a>	1494	99%	0.0	99%
<a href="#">AAL69542.1</a>	Vip3A [Bacillus thuringiensis] >qb AAO32350.1  Vip184 [Bacillus th	<a href="#">1494</a>	1494	99%	0.0	99%
<a href="#">AAW62286.1</a>	vegetative insecticidal protein [Bacillus thuringiensis]	<a href="#">1494</a>	1494	99%	0.0	99%

Figura 8. Alinhamento da sequência do gene *vip3Aa43* obtido a partir da linhagem padrão *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD1, realizado dia 19 de setembro de 2010, utilizando o algoritmo BLASTX, da ferramenta BLAST, disponível publicamente na página do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Das 14 sequências que apresentaram 100% de similaridade com o gene *vip3Aa43*, nove apresentam-se agrupadas e classificadas no banco de dados “*Bacillus thuringiensis*: Toxin Nomenclature”

([http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil\\_Crickmore/Bt/](http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/)) como se pode observar na Figura 9.

E destas, cinco apresentam 100% de similaridade também em suas sequências de nucleotídeos, sendo elas: Vip3Aa15 – gb[AAP51131.1], Vip3Aa21 – gb[ABD84410.1], Vip3Aa33 – gb[ACY38212.1], Vip3Aa34 – gb[ACY38213.1] e Vip3Aa36 – gb[ADF43020.1].

Vip3Aa7	Vip83	<a href="#">AAK95326</a>	Cai et al	2001	unpublished	Bt YBT-833
Vip3Aa10	Vip3V	<a href="#">AAN60738</a>	Doss et al	2002	<a href="#">Protein Expr. Purif 26, 82-88</a>	Bt
Vip3Aa11	Vip3A	<a href="#">AAR36859</a>	Liu et al	2003	unpublished	Bt C9
Vip3Aa15	Vip3A	<a href="#">AAP51131</a>	Wu et al	2004	unpublished	Bt WB50
Vip3Aa21	Vip	<a href="#">ABD84410</a>	Panbangred	2006	unpublished	Bt aizawai
Vip3Aa33		GU073128	Diego Sauka	2009		Btk HD1
Vip3Aa34		GU073129	Diego Sauka	2009		INTA TA24-6
Vip3Aa36		GU951510	Feng et al	2010		
Vip3Aa37		HM132041	Sauka et al	2010		Bt HD110

Figura 9. Proteínas Vip3Aa classificadas no banco de dados *Bacillus thuringiensis*: Toxin Nomenclature (CRICKMORE et al. 2010), que apresentaram similaridade a proteína Vip3Aa43 obtida a partir da linhagem padrão *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD1.

Na figura 10 esta ilustrado o alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas Vip3Aa depositadas nos bancos de dados de proteínas do NCBI com a proteína Vip3Aa43, onde pode-se observar que não ocorreu nenhuma substituição de aminoácidos, demonstrando ser esta, uma proteína Vip3Aa idêntica às 14 proteínas anteriormente descritas.

Em estudo realizado por DOSS et al. (2002) com a proteína Vip3Aa10, também sequenciada a partir da linhagem padrão *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, foi possível observar diferenças em cinco aminoácidos quando comparadas com as proteínas Vip3Aa1, Vip3Aa2 e Vip3Aa9 previamente descritas, sendo elas: glutamina (Vip3Aa1) por lisina (Vip3Aa10) no resíduo 284, arginina (Vip3Aa2) por leucina (Vip3Aa10) no resíduo 206, prolina (Vip3Aa2) por treonina (Vip3Aa10) no resíduo 291, glicina (Vip3Aa2) por ácido glutâmico (Vip3Aa10) no resíduo 406 e glicina (Vip3Aa9) por ácido glutâmico (Vip3Aa10) no resíduo 742.

Já em ensaios para análise da toxicidade, DOSS et al. (2002) observaram que a proteína Vip3Aa10 apresentou 50% de mortalidade em *A. ipsilon* em uma concentração de 80 ng/cm<sup>2</sup>, enquanto que para a proteína Vip3Aa9 esta concentração foi de 2156 ng/cm<sup>2</sup>, para uma mortalidade de 50% (SELVAPANDIYAN et al. 2001) e para a proteína Vip3Aa1 a concentração necessária é de 62 ng/cm<sup>2</sup> para obter uma mortalidade de 100% das larvas (ESTRUCH et al. 1996).

No entanto, para uma eficiência de 50% no controle de *S. lituria* e *P. xylostella*, concentrações de 5 e 36 ng/cm<sup>2</sup> da proteína Vip3Aa9 foram necessárias (SELVAPANDIYAN et al. 2001), enquanto que 45 e 220 ng/cm<sup>2</sup> foram necessárias da proteína Vip3Aa10 (DOSS et al. 2002).

Neste sentido, verificou-se que apenas cinco diferenças nas sequências de aminoácido das proteínas foram suficientes para alterar a especificidade entre diferentes insetos praga da ordem Lepidoptera. Portanto, estudos se fazem necessários para esclarecer qual espécie é mais suscetível a cada uma das proteínas obtidas no presente estudo.

Score = 1496 bits (3873), Expect = 0.0  
 Identities = 789/789 (100%), Positives = 789/789 (100%), Gaps = 0/789 (0%)  
 Frame = +1

<i>vip3Aa43</i>	1	MNKNNTKLSTRALPSFIDYFNIGIYGFATGIKDIMNMIFKTDTGGDLTLDEILKNQQLLND	180
		MNKNNTKLSTRALPSFIDYFNIGIYGFATGIKDIMNMIFKTDTGGDLTLDEILKNQQLLND	
<i>vip3Aa</i>	1	MNKNNTKLSTRALPSFIDYFNIGIYGFATGIKDIMNMIFKTDTGGDLTLDEILKNQQLLND	60
<i>vip3Aa43</i>	181	ISGKLDGVNGSLNDLIAQGNLNTLSKEILKIANEQNQVLNDVNNKLDIAINTMLRVYLPK	360
		ISGKLDGVNGSLNDLIAQGNLNTLSKEILKIANEQNQVLNDVNNKLDIAINTMLRVYLPK	
<i>vip3Aa</i>	61	ISGKLDGVNGSLNDLIAQGNLNTLSKEILKIANEQNQVLNDVNNKLDIAINTMLRVYLPK	120
<i>vip3Aa43</i>	361	ITSMLSDVMKQNYALSLQIEYLSKQLQEISDKLDIINVNVLINSTLTEITPAYQRIKYVN	540
		ITSMLSDVMKQNYALSLQIEYLSKQLQEISDKLDIINVNVLINSTLTEITPAYQRIKYVN	
<i>vip3Aa</i>	121	ITSMLSDVMKQNYALSLQIEYLSKQLQEISDKLDIINVNVLINSTLTEITPAYQRIKYVN	180
<i>vip3Aa43</i>	541	EKFEELTFATETSSKVKKDGGSPADILDELTELAKSVTKNDVDGFEFYLNTHFDVMVG	720
		EKFEELTFATETSSKVKKDGGSPADILDELTELAKSVTKNDVDGFEFYLNTHFDVMVG	
<i>vip3Aa</i>	181	EKFEELTFATETSSKVKKDGGSPADILDELTELAKSVTKNDVDGFEFYLNTHFDVMVG	240
<i>vip3Aa43</i>	721	NNLFGRSALKTASELITKENVKTSGSEVGNVYNFLIVLTLAQAKAFLTLTTCRKLGLAD	900
		NNLFGRSALKTASELITKENVKTSGSEVGNVYNFLIVLTLAQAKAFLTLTTCRKLGLAD	
<i>vip3Aa</i>	241	NNLFGRSALKTASELITKENVKTSGSEVGNVYNFLIVLTLAQAKAFLTLTTCRKLGLAD	300
<i>vip3Aa43</i>	901	IDYTSIMNEHLNKEKEEFRVNILPTLSNTFSNPNYAKVKGSEDEAKMIVEAKPGHALIGF	1080
		IDYTSIMNEHLNKEKEEFRVNILPTLSNTFSNPNYAKVKGSEDEAKMIVEAKPGHALIGF	
<i>vip3Aa</i>	301	IDYTSIMNEHLNKEKEEFRVNILPTLSNTFSNPNYAKVKGSEDEAKMIVEAKPGHALIGF	360
<i>vip3Aa43</i>	1081	EISNDSITVLKVYEAKLKQNYQVDKDSLSEVIYGDMDKLLCPDQSEQIYYTNNIVFPNEY	1260
		EISNDSITVLKVYEAKLKQNYQVDKDSLSEVIYGDMDKLLCPDQSEQIYYTNNIVFPNEY	
<i>vip3Aa</i>	361	EISNDSITVLKVYEAKLKQNYQVDKDSLSEVIYGDMDKLLCPDQSEQIYYTNNIVFPNEY	420
<i>vip3Aa43</i>	1261	VITKIDFTKKMKTTLRYEVTANFYDSSTGEIDLNKKKVESSEAEYRTPSANDDGVYMPGLV	1440
		VITKIDFTKKMKTTLRYEVTANFYDSSTGEIDLNKKKVESSEAEYRTPSANDDGVYMPGLV	
<i>vip3Aa</i>	421	VITKIDFTKKMKTTLRYEVTANFYDSSTGEIDLNKKKVESSEAEYRTPSANDDGVYMPGLV	480
<i>vip3Aa43</i>	1441	ISETFLTPINGFGLQADENSRLITLTKSYLRELLLATDLSNKETKLIIVPPSGFISNIVE	1620
		ISETFLTPINGFGLQADENSRLITLTKSYLRELLLATDLSNKETKLIIVPPSGFISNIVE	
<i>vip3Aa</i>	481	ISETFLTPINGFGLQADENSRLITLTKSYLRELLLATDLSNKETKLIIVPPSGFISNIVE	540
<i>vip3Aa43</i>	1621	NGSIEEDNLEPWKANNKNAYVDHTGGVNGTKALYVHKDGGISQFIGDKLKPTEYVIQYT	1800
		NGSIEEDNLEPWKANNKNAYVDHTGGVNGTKALYVHKDGGISQFIGDKLKPTEYVIQYT	
<i>vip3Aa</i>	541	NGSIEEDNLEPWKANNKNAYVDHTGGVNGTKALYVHKDGGISQFIGDKLKPTEYVIQYT	600
<i>vip3Aa43</i>	1801	VKGKPSIHLKDENTGYIHYEDTNNNLEDYQTIINKRFTTGTDLKGVYLILKSQNGDEAWGD	1980
		VKGKPSIHLKDENTGYIHYEDTNNNLEDYQTIINKRFTTGTDLKGVYLILKSQNGDEAWGD	
<i>vip3Aa</i>	601	VKGKPSIHLKDENTGYIHYEDTNNNLEDYQTIINKRFTTGTDLKGVYLILKSQNGDEAWGD	660
<i>vip3Aa43</i>	1981	NFIIILEISPSEKLLSPELINTNNWTSTGSTNISGNTLTLYQGGRGILKQNLQLDSFSTYR	2160
		NFIIILEISPSEKLLSPELINTNNWTSTGSTNISGNTLTLYQGGRGILKQNLQLDSFSTYR	
<i>vip3Aa</i>	661	NFIIILEISPSEKLLSPELINTNNWTSTGSTNISGNTLTLYQGGRGILKQNLQLDSFSTYR	720
<i>vip3Aa43</i>	2161	VYFSVSGDANVRIRNSREVLFEKRYMSGAKDVSEMFTTKFEKDNFYIELSQGNNLYGGPI	2340
		VYFSVSGDANVRIRNSREVLFEKRYMSGAKDVSEMFTTKFEKDNFYIELSQGNNLYGGPI	
<i>vip3Aa</i>	721	VYFSVSGDANVRIRNSREVLFEKRYMSGAKDVSEMFTTKFEKDNFYIELSQGNNLYGGPI	780
<i>vip3Aa43</i>	2341	VHFDVSIK 2367	
		VHFDVSIK	
<i>vip3Aa</i>	781	VHFDVSIK 789	

Figura 10. Alinhamento da sequência de aminoácidos da proteína Vip3Aa43 obtida a partir da linhagem padrão *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD1 com as proteínas Vip3Aa depositadas nos bancos de dados de proteínas do NCBI.



### 5.5.2. Análise do gene *vip3Aa* da linhagem padrão *B. thuringiensis* var. *tolworthi* HD125

Para a linhagem padrão *B. thuringiensis* var. *tolworthi* HD125, a sequência consenso para o gene *vip3Aa* apresentou 2370 bases com qualidade *phred* média de 85.7 por base, o que corresponde a uma probabilidade de erro menor que 0,000001% e 789 aminoácidos (Figura 11).

Esta sequência foi primeiramente enviada ao banco de dados GenBank recebendo o número de acesso (GenBank: [HQ587048]) e posteriormente, enviada ao banco de dados *Bacillus thuringiensis*: Toxin Nomenclature ([http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil\\_Crickmore/Bt/](http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/)) no qual foi classificada e agrupada recebendo a nomenclatura de gene *vip3Aa42*.

Utilizando o algoritmo BLASTX, da ferramenta BLAST (ALTSCHUL et al. 1990), disponível publicamente no site do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), foram feitas comparações da sequência do gene *vip3Aa42*, contra o banco de dados de proteínas do NCBI do dia 19 de setembro de 2010.

Verificou-se que a sequência de aminoácidos apresenta 99% de similaridade com a sequência do gene *vip3Aa35* – gb[ADE06071.1] (AUDTHO et al. 2010), sequenciado a partir do isolado M190 de *B. thuringiensis* (Figura 12).

Duas substituições de bases foram detectadas quando as sequências foram alinhadas através do uso do algoritmo BLAST 2Seq da ferramenta BLAST (Figura 13), sendo elas: A (*vip3Aa35*) por G (*vip3Aa42*) na posição da base 1450 e G (*vip3Aa35*) por A (*vip3Aa42*) na posição da base 1976.

1	<b>atgaacaagaataataactaaattaagc</b> acaagagccttacc	1216	gaacaaatctattatacaaaataacatagttttccaaatgaat
	<b>M N K N N T K L S T R A L P S</b>		<b>E Q I Y Y T N N I V F P N E Y</b>
46	tttattgattat <del>ttta</del> taaggcatttatggatttgc	1261	gtaattactaaaattgattttactaaaaaatgaaaactttaaga
	<b>F I D Y F N G I Y G F A T G I</b>		<b>V I T K I D F T K K M K T L R</b>
91	aaagacattatgaacatgatttttaaaacggatcacaggtggtgat	1306	tatgaggtaacagcgaatttttatgattctctacaggagaaatt
	<b>K D I M N M I F K T D T G G D</b>		<b>Y E V T A N F Y D S S T G E I</b>
136	ctaaccctagacgaaat <del>ttta</del> agaatcagcagttactaaatgat	1351	gacttaaataagaaaaagtagaatcaagtgaagcgggagtataga
	<b>L T L D E I L K N Q Q L L N D</b>		<b>D L N K K K V E S S E A E Y R</b>
181	at <del>ttc</del> tggt <del>aaatt</del> ggatgggtggaatggaagcctaaatgatcctt	1396	acgt <del>taagtgcta</del> atgatgatgg
	<b>I S G K L D G V N G S L N D L</b>		<b>agtgatatgccgttaggtgct</b>
226	atcgcacagggaaact <del>ta</del> atacagaattatc <del>ta</del> agaaatatta	1441	atcagtgaagcatttttgactccgattaatgggttggcctcaa
	<b>I A Q G N L N T E L S K E I L</b>		<b>I S E A F L T P I N G F G L Q</b>
271	aaaattgcaaatgaacaaaaatcaagttt <del>ta</del> aatgatg <del>tt</del> aaataac	1486	gctgatgaaaattcaagataattactt <del>ta</del> acatg <del>ta</del> aatcatat
	<b>K I A N E L S N V M K Q V L N D V N S N</b>		<b>A D E N S R L I T L T C K G E Y</b>
316	aaactcgatgcgataaatacgatgcttcgggtatatactac <del>ta</del> aa	1531	ttaagagaactactgctagcaacagact <del>ta</del> agcaataaagaaact
	<b>K L D A I N T M L R V Y L P K</b>		<b>L R E L L L A T D L S N K E T</b>
361	attac <del>ctc</del> tatg <del>ttg</del> agtgatg <del>ta</del> atg <del>aa</del> caaaaattatgcgcta	1576	aaattgatcgtcccgccaagtggtttt <del>ta</del> aaaaatattgtagag
	<b>I T S M L S D V M K Q N Y A L</b>		<b>K L I V P P S G F T L I K N I Y E</b>
406	agtctgcaaatagaatac <del>ta</del> taagtaaaacaattgcaagagatttct	1621	aacgggtccatagaagaggacaatt <del>ta</del> gagccgtggaagcaaat
	<b>S L Q I E Y L S K Q L Q E I S</b>		<b>N G S I E E D N L E P W K A N</b>
451	gataagttgatatt <del>ta</del> atg <del>ta</del> aatg <del>ta</del> ctact <del>ta</del> aaac <del>ct</del> aca	1666	aataagaatgcgtatgtagatcatacagggcggatggaact
	<b>D K L D I I N V N V L I N S T</b>		<b>A N K N A Y V D H T G G V N G T</b>
496	<del>ctt</del> actg <del>aa</del> att <del>ca</del> ctgc <del>gt</del> gatcaaaggatt <del>ta</del> aatatg <del>ta</del> gaac	1711	aaagctttatagttc <del>ta</del> taaggcgggaatt <del>ta</del> cacaatttatt
	<b>L T E I T P A Y Q R I K Y V N</b>		<b>K A L Y V H K D G G I S Q F I</b>
541	gaaaaattgaggaatt <del>aa</del> cttttgc <del>ta</del> cagaaactag <del>tt</del> caaaa	1756	ggagataaggt <del>ta</del> aaaccgaaaactgagatg <del>ta</del> aatccaatatact
	<b>E K F E E L T F A T E T S S K</b>		<b>G A D K L K P K T E Y V I Q Y T</b>
586	gtaaaaaaggatggctc <del>tc</del> ctc <del>tg</del> cagatatt <del>ct</del> tg <del>ta</del> gag <del>tt</del> aaact	1801	gt <del>ta</del> aaaggaaaac <del>ct</del> tctattcatt <del>ta</del> aaagatg <del>aa</del> aaaactgga
	<b>V K K D G S P A D I L D E L T</b>		<b>V K G K P S I H L K D E N T G</b>
631	gag <del>tt</del> aaactg <del>aa</del> ctagc <del>g</del> aaaagtg <del>ta</del> acaaaaaatgatg <del>tt</del> ggat	1846	tatattcattatg <del>aa</del> gat <del>ca</del> aaataa <del>at</del> ttt <del>ga</del> agadatt <del>ca</del> aa
	<b>E L T E L S D V M K S V T K N D V D</b>		<b>Y I H Y E D T T N N N L E A D Y Q</b>
676	gg <del>tt</del> tttaatt <del>tt</del> ta <del>ct</del> taatacatt <del>tc</del> ccagatg <del>ta</del> aatg <del>tt</del> gga	1891	actattactaaacg <del>tt</del> tact <del>na</del> acggaaactg <del>tt</del> taaaagggatg
	<b>G F E F Y L N T F H D V M V G</b>		<b>T I T K R F T T G T D L K G V</b>
721	aataatt <del>tt</del> atc <del>gg</del> gcg <del>tt</del> cag <del>ct</del> taaaaaactg <del>ca</del> tcggaatta	1936	tatt <del>ta</del> at <del>tt</del> taaaaaag <del>t</del> c <del>aa</del> aatggagatg <del>aa</del> gcttgggaaagat
	<b>N L F G R S A A L K T A S E E L</b>		<b>Y L I L K S Q N G D E A W E D</b>
766	attactaaagaaaatgtg <del>aa</del> aaa <del>ca</del> ag <del>tg</del> gcag <del>tg</del> ag <del>gt</del> cgga <del>at</del>	1981	aactttattat <del>tt</del> tg <del>aa</del> aatg <del>at</del> gc <del>ctt</del> ctg <del>aa</del> aaag <del>tt</del> attaag <del>t</del>
	<b>I T K E N V K T S G S E V G N</b>		<b>N F I I L E I S P S E K L L S</b>
811	gtttataact <del>ct</del> taattg <del>ta</del> ttaacag <del>ct</del> ctgcaagcaaaagct	2026	<del>cc</del> agaat <del>ta</del> attaatacaaaat <del>at</del> gg <del>ac</del> gag <del>ta</del> c <del>gg</del> gat <del>ca</del> act
	<b>V Y N F L I V L T A L Q A K A</b>		<b>P E L I N T N N W T S T G S T</b>
856	ttcttact <del>tt</del> aaacaactgc <del>cg</del> aaaatt <del>ta</del> tagg <del>ct</del> tagcagat	2071	aatattcggg <del>ta</del> atacactcact <del>ct</del> ttatcaggggagcagga
	<b>F L T L T T C R K L L G L A D</b>		<b>N I S G N T L T L Y Q G G R G</b>
901	attgattatact <del>ct</del> tattatg <del>aa</del> tgaacatt <del>ta</del> aaataag <del>g</del> aaaaa	2116	attc <del>ta</del> aaacaaaac <del>ct</del> tcaattagatag <del>tt</del> tttcaacttataga
	<b>I D Y T S I M N E H L N K E K</b>		<b>I L K Q N L Q L D S F S T Y R</b>
946	gag <del>aa</del> atttagag <del>ta</del> aaactc <del>tc</del> cc <del>ta</del> cact <del>tt</del> ctaataact <del>tt</del>	2161	gtg <del>tt</del> ttt <del>ct</del> gtg <del>tc</del> cg <del>ga</del> gatg <del>ct</del> aatg <del>ta</del> aggattaga <del>aa</del> t
	<b>E E F R V N I L P T L S N T F</b>		<b>V Y F S V S G D A N V R I R N</b>
991	tcta <del>tc</del> taattatg <del>ca</del> aaaag <del>tt</del> aaaggaag <del>tg</del> atg <del>aa</del> gatg <del>ca</del> s	2206	tctaggg <del>aa</del> g <del>tg</del> t <del>tt</del> ttg <del>aa</del> aaaagat <del>at</del> atgagcgg <del>tg</del> ctaaa
	<b>S N P N Y A K V K G S D E D A</b>		<b>S R E V L F E K R Y M S G A K</b>
1036	aagatgatt <del>tg</del> ggaagc <del>ta</del> aac <del>ca</del> gg <del>ac</del> atg <del>ca</del> ttg <del>gt</del> gg <del>gt</del> g <del>tt</del>	2251	gatg <del>tt</del> ctg <del>aa</del> at <del>tt</del> ctactacaaaat <del>tg</del> gg <del>aa</del> agataa <del>ct</del> tt
	<b>K M I V E A K P G H A L V G F</b>		<b>D V S E I F T T K L G K D N F</b>
1081	gaaattag <del>ta</del> atgatt <del>ca</del> attacag <del>ta</del> t <del>ta</del> aaag <del>ta</del> tatgag <del>gc</del> t	2296	tatatag <del>ac</del> ttt <del>ct</del> caaggg <del>aa</del> ataatt <del>ta</del> aatg <del>gt</del> gg <del>cc</del> ctatt
	<b>E I S N D S I T V L K V Y E A</b>		<b>Y I E L S Q G N N L N G G P I</b>
1126	aagc <del>ta</del> aaaa <del>ca</del> aaat <del>ta</del> caag <del>tt</del> gataag <del>ga</del> t <del>tc</del> ttatc <del>g</del> gaa	2341	gtc <del>aa</del> g <del>ttt</del> ccg <del>at</del> g <del>ct</del> ct <del>ta</del> taag <del>ta</del> a 2370
	<b>K L K Q N Y Q V D K D S L S E</b>		<b>V K F S D V S I K *</b>
1171	gttattatg <del>gt</del> gat <del>at</del> g <del>ga</del> taaa <del>tt</del> att <del>gt</del> g <del>cc</del> caga <del>at</del> caat <del>ct</del>		
	<b>V I Y G D M D K L L C P D Q S</b>		

Figura 11. Sequência de nucleotídeos e deduzida de aminoácidos do gene *vip3Aa42* (GenBank: [HQ587048]) obtido a partir da linhagem padrão *B. thuringiensis* var. *tolworthi* HD125. A metionina inicial e o códon de parada estão representados em negrito e em destaque estão os oligonucleotídeos utilizados na estratégia de “primer walking”, onde em verde estão os oligonucleotídeos direto e em amarelo os oligonucleotídeos reverso.

Sequences producing significant alignments:						
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
<a href="#">ADE06071.1</a>	Vip190 [Bacillus thuringiensis]	<a href="#">1488</a>	1488	99%	0.0	99%
<a href="#">AAN60738.1</a>	vegetative insecticidal protein Vip3V [Bacillus thuringiensis] >qb AA	<a href="#">1470</a>	1470	99%	0.0	98%
<a href="#">AAW65132.1</a>	vegetative insecticidal protein [Bacillus thuringiensis]	<a href="#">1469</a>	1469	99%	0.0	98%
<a href="#">AAC37036.1</a>	vip3A(a) [Bacillus thuringiensis] >qb AAQ23140.2  VIP3AI [syntheti	<a href="#">1468</a>	1468	99%	0.0	98%
<a href="#">AAL69542.1</a>	Vip3A [Bacillus thuringiensis] >qb AAO32350.1  Vip184 [Bacillus thi	<a href="#">1468</a>	1468	99%	0.0	98%

Figura 12. Alinhamento da sequência do gene *vip3Aa42* obtido a partir da linhagem padrão *B. thuringiensis* var. *tolworthi* HD125, realizado dia 19 de setembro de 2010, utilizando o algoritmo BLASTX, da ferramenta BLAST, disponível publicamente no NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

```

>lcl|43657 gi|291465231|gb|GU733921.1| Bacillus thuringiensis strain M190
Vip190 gene, complete cds
Length=2370

Score = 4366 bits (2364), Expect = 0.0
Identities = 2368/2370 (99%), Gaps = 0/2370 (0%)
Strand=Plus/Plus

vip3Aa42 1441 ATCAGTGAAGCATT TTTTGACTCCGATTAATGGGTTTGGCCTCCAAGCTGATGAAAATTCA 1500
|||||  |||
vip3Aa35 1441 ATCAGTGAACAATT TTTTGACTCCGATTAATGGGTTTGGCCTCCAAGCTGATGAAAATTCA 1500
|||||  |||

vip3Aa42 1921 GATT TAAAGGGAGTGTATTTAATTTTAAAAAGTCAAAATGGAGATGAAGCTTGGGAAAGAT 1980
|||||  |||
vip3Aa35 1921 GATT TAAAGGGAGTGTATTTAATTTTAAAAAGTCAAAATGGAGATGAAGCTTGGGGAGAT 1980
|||||  |||

```

Figura 13. Alinhamento da sequência de nucleotídeos do gene *vip3Aa42* obtido a partir da linhagem padrão *B. thuringiensis* var. *tolworthi* HD125 com o gene *vip3Aa35*. Em amarelo estão destacadas as substituições de nucleotídeos. Em vermelho estão delimitados os códons cujas substituições de nucleotídeos geraram alterações nos aminoácidos.

As substituições de nucleotídeos resultaram na substituição dos aminoácidos treonina (*vip3Aa35*) por alanina (*vip3Aa42*) (ACA por GCA – resíduo 484) e glicina (*vip3Aa35*) por ácido glutâmico (*vip3Aa42*) (GGA por GAA – resíduo 659) (Figura 14).

[gb|ADE06071.1](#) Vip190 [*Bacillus thuringiensis*]  
Length=789  
Score = 1488 bits (3851), Expect = 0.0  
Identities = 787/789 (99%), Positives = 787/789 (99%), Gaps = 0/789 (0%)  
Frame = +1

<i>vip3Aa42</i>	1	MNKNNTKLSTRALPSFIDYFNGIYGFATGIKDIMNMI FKTDGDTGGDLTLDE ILKNQQLLND	180
<i>vip3Aa35</i>	1	MNKNNTKLSTRALPSFIDYFNGIYGFATGIKDIMNMI FKTDGDTGGDLTLDE ILKNQQLLND	60
<i>vip3Aa42</i>	181	ISGKLDGVNGSLNDLIAQGNLNTLSKEILKIANEQVQLNDVNNKLD AINTMLRVYLPK	360
<i>vip3Aa35</i>	61	ISGKLDGVNGSLNDLIAQGNLNTLSKEILKIANEQVQLNDVNNKLD AINTMLRVYLPK	120
<i>vip3Aa42</i>	361	ITSMLSDVMKQNYALSLQIEYLSKQLQEISDKLDI INVNVLINSTL TEITPAYQRIKYVN	540
<i>vip3Aa35</i>	121	ITSMLSDVMKQNYALSLQIEYLSKQLQEISDKLDI INVNVLINSTL TEITPAYQRIKYVN	180
<i>vip3Aa42</i>	541	EKFEELTFATETSSKVKKDGGSPADILDELTELTELAKSVTKNDVDGFEFYLNTHFDVMVG	720
<i>vip3Aa35</i>	181	EKFEELTFATETSSKVKKDGGSPADILDELTELTELAKSVTKNDVDGFEFYLNTHFDVMVG	240
<i>vip3Aa42</i>	721	NNLFGRSALKTASELITKENVKTSGSEVGNVYNFLIVLTALQAKAFLTLTTCRKLGLAD	900
<i>vip3Aa35</i>	241	NNLFGRSALKTASELITKENVKTSGSEVGNVYNFLIVLTALQAKAFLTLTTCRKLGLAD	300
<i>vip3Aa42</i>	901	IDYTSIMNEHLNKEKEEFRVNI LPTLSNTFSNPNYAKVKGSD EDAKMIVEAKPGHALVGF	1080
<i>vip3Aa35</i>	301	IDYTSIMNEHLNKEKEEFRVNI LPTLSNTFSNPNYAKVKGSD EDAKMIVEAKPGHALVGF	360
<i>vip3Aa42</i>	1081	EISNDSITVLKVYEA K LKQNYQVDKDSLSEVIYGDMDKLLCPDQSEQIYYTNNIVFPNEY	1260
<i>vip3Aa35</i>	361	EISNDSITVLKVYEA K LKQNYQVDKDSLSEVIYGDMDKLLCPDQSEQIYYTNNIVFPNEY	420
<i>vip3Aa42</i>	1261	VITKIDFTKKMKT LRYEVTANFYDSSTGEIDLNKKKVESSEAEYRTLSANDDGVYMP LGV	1440
<i>vip3Aa35</i>	421	VITKIDFTKKMKT LRYEVTANFYDSSTGEIDLNKKKVESSEAEYRTLSANDDGVYMP LGV	480
<i>vip3Aa42</i>	1441	ISEAFLTPINGFGLQADENSRLITLTCKSYLRELLLATDLSNKETKLI VPPSGFIKNIVE	1620
<i>vip3Aa35</i>	481	ISEAFLTPINGFGLQADENSRLITLTCKSYLRELLLATDLSNKETKLI VPPSGFIKNIVE	540
<i>vip3Aa42</i>	1621	NGSIEEDNLEPWKANNKNAYVDHTGGVNGTKALYVHKDGGISQFIGDKLKP KTEYVIQYT	1800
<i>vip3Aa35</i>	541	NGSIEEDNLEPWKANNKNAYVDHTGGVNGTKALYVHKDGGISQFIGDKLKP KTEYVIQYT	600
<i>vip3Aa42</i>	1801	VKGKPSIHLKDENTGYIHYEDTNNNLEDYQTITKRFTGTDLKGVYLILKSQNGDEAWD	1980
<i>vip3Aa35</i>	601	VKGKPSIHLKDENTGYIHYEDTNNNLEDYQTITKRFTGTDLKGVYLILKSQNGDEAWGD	660
<i>vip3Aa42</i>	1981	NFIILEISPSEKLLSPELINTNNWTSTGSTNISGNTLTLYQGGRGILKQNLQLDSFSTYR	2160
<i>vip3Aa35</i>	661	NFIILEISPSEKLLSPELINTNNWTSTGSTNISGNTLTLYQGGRGILKQNLQLDSFSTYR	720
<i>vip3Aa42</i>	2161	VYFSVSGDANVRIRNSREVLFEKRYMSGAKDVSEIFTTKLGKDNFYIELSQGNLNGGPI	2340
<i>vip3Aa35</i>	721	VYFSVSGDANVRIRNSREVLFEKRYMSGAKDVSEIFTTKLGKDNFYIELSQGNLNGGPI	780
<i>vip3Aa42</i>	2341	VKFSDVSIK 2367	
		VKFSDVSIK	
<i>vip3Aa35</i>	781	VKFSDVSIK 789	

Figura 14. Alinhamento das sequências de aminoácidos da proteína Vip3Aa42 obtida a partir da linhagem padrão *B. thuringiensis* var. *tolworthi* HD125 com a proteína Vip3Aa35. Em amarelo estão destacadas as substituições de aminoácidos: treonina por alanina e glicina por ácido glutâmico.

A presença de substituições de aminoácidos na proteína Vip3Aa42 faz com que esta se diferencie das proteínas Vip3Aa agrupadas nos bancos de dados, evidenciando desta forma a presença de uma nova proteína, pertencente à subclasse vip3Aa.

A subclasse vip3Aa compreende até o momento 43 genes, classificados de *vip3Aa1* a *vip3Aa43* ([http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil\\_Crickmore/Bt/](http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/)). Esses genes possuem um grau de similaridade entre si de, aproximadamente, 99% e apresentam toxicidade a insetos da ordem Lepidoptera (BHALLA et al. 2005; FANG et al. 2007; DOSS et al. 2002). No entanto, apesar da sequência de aminoácidos do gene *vip3Aa35* (AUDTHO et al. 2010) ter sido depositada no banco de dados GenBank e no banco de dados acima referido, até o momento não existem informações sobre sua toxicidade e modo de ação.

Desta forma, estudos envolvendo a toxicidade desta nova proteína deverão ser realizados a fim de se esclarecer a sua especificidade.

### **5.5.3. Análise do gene *vip3A* do isolado I187 de *B. thuringiensis***

Para o isolado I187 de *B. thuringiensis* a sequência consenso do gene *vip3A* apresentou 2364 bases com qualidade *phred* média de 81.5 por base, o que corresponde a uma probabilidade de erro menor que 0,000001% e 787 aminoácidos (Figura 15).

Esta sequência foi primeiramente enviada ao banco de dados GenBank recebendo o número de acesso (GenBank: [HQ542193]) e posteriormente, enviada ao banco de dados *Bacillus thuringiensis*: Toxin Nomenclature ([http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil\\_Crickmore/Bt/](http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/)) no qual foi classificada e agrupada recebendo a nomenclatura de gene *vip3Ag5*.

Utilizando o algoritmo BLASTX, da ferramenta BLAST (ALTSCHUL et al. 1990), disponível publicamente no site do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), foram feitas comparações da sequência do gene *vip3Ag5*, contra o banco de dados de proteínas do NCBI do dia 19 de setembro de 2010.

Verificou-se que o gene obtido apresenta uma sequência de aminoácidos com 99% de similaridade com o a sequência do gene *vip3Ag2* – gb[ACL97352.1] (AUDTHO et al. 2008), sequenciado a partir do isolado M191 de *B. thuringiensis* (Figura 16).

1	<b>atgaacaagaataactaactaattaagc</b> gcaagggccttaccgagt	1216	gaacaaatatattatacaataacattgcttttcccaatgaatat
	<b>M N K N N T K L S A R A L P S</b>		E Q I Y Y T N N I A F P N E Y
46	tttattgattatitaaatggcatttatggatttgccactggatc	1261	gtaataactaaaattacttttactaaaaaatgaatagttaaga
	<b>F I D Y F N G I Y G F A T G I</b>		V I T K I T F T K K M N S L R
91	aaagacattatgaacatgatttttaaaacggatcacaggtggaat	1306	tatgaggcaacagctaatTTTTATGATTCTTCTACAGGGGATATT
	<b>K D I M N N M I F K T D T G G N</b>		<b>Y E A T A N F Y D S S T G D I</b>
136	ctaaccctagacgaaatTTTAAAAATCAGCAGTTATTAATGAG	1351	gatctaaataagacaaaagtagaatcaagtgaagcagagtagt
	<b>L T L D E I L K N Q Q L L N E</b>		<b>D L N K T K V E S S E A E Y S</b>
181	atTTCTGGTAAATGGGATGGGGTAAATGGGAGCTTAAACGATCTT	1396	acgctaagtgtactgtatggagcttatatgccggttaggtatt
	<b>I S G K L D G V N G S L N D L</b>		<b>T L S A S T D G V Y M P L G I</b>
226	atcgcacagggaaacttaataacagaattatctaaggaactctta	1441	atcagtgaaacatTTTTGACTCCAATTAATGGGTTTGAATCGTA
	<b>I A Q G N L N T E L S K E I L</b>		<b>I S E T F L T P I N G F G I V</b>
271	aaaattgcaaatgagcagaatcaagtcttaaatgatgtaataaac	1486	gtcogatgaaaattcaaaattagtaaattaacatgtaaatcatat
	<b>K I A N E N D V M K L N D V N A L</b>		<b>Y E E N S K L I G F N I T C K G D I</b>
316	aaacttaatgcgataataacaatgcttcacatatatctacctaaa	1531	ttaagagaggtattattagcaacagacttaagtaataaagaaact
	<b>K L N A I N T M L H I Y L P K</b>		<b>L R E V L L A T D L S N K E T</b>
361	attacatctatgttaaatgatgtaaatgaaacaaaattatgcacta	1576	aaattgatgtcccactattggTTTTATTAGCAATATTGTAGAA
	<b>I T S E L A N D V M K Q I N Y A N L</b>		<b>A I V P P I G F I M P L G I</b>
406	agtctgcaaatagaatacctaagtaacaattgcaagaa <b>atttcc</b>	1621	aatgggaacttagagggagaaaacttagagccgtggaagcaaat
	<b>S L Q I E Y L S K Q L Q E I S</b>		<b>N G N L E G E N L E P W K A N</b>
451	<b>gacaagttagatg</b> tcattaacgtgaatgtacttattaact <b>ctaca</b>	1666	aacaaaaatgctgatgtagatcatacagggcggcgtaaatggaact
	<b>D K L D V I N V N V L I N I S T</b>		<b>N K N A Y V D H T G G V N G T</b>
496	<b>cttactgaaattacacgtgc</b> gtatcaacggatgaaatagttaaat	1711	aaagctttatagtgtcataaggtggtgagttttcacaatttatt
	<b>L T E I T P A Y Q R M K Y V N</b>		<b>K A L Y V H K D G E F S Q F I</b>
541	gaaaaatttgaagatttaactTTTGTACAGAAACCCTTTAAAA	1756	ggagataagttgaaatcgaaaacagaatagttaattcaatatt
	<b>E K F E D L T F A T E T T L K</b>		<b>G D K L K S K T E Y V I Q Y I</b>
586	gtaaaaagaatagctccocctgcagatattcttgatgagttact	1801	Gtaaaagggaaaagcttcttctttgaaagatgaaaaaatggt
	<b>V K K N S S P A D I L D E L T</b>		<b>V K G K A S I L L K D E K N G</b>
631	gagttactgaactagcgaaaagtgtacaacaaaatgacgtggat	1846	gattgcatttatgaagatacaaaataggTTTAGAAGATTTTCAA
	<b>E L T E L A K S V T K N D V D</b>		<b>D C I Y E D T I N N G L E D F Q</b>
676	ggttttgaatTTTACCTTAATACATTTCA <b>cgatgtaatggtagga</b>	1891	accataactaaaagttttattacaggaacggattcttcaggagtt
	<b>G F E F Y L N T F H D V M V G</b>		<b>T I T K S F I T G T D S S G V</b>
721	<b>aa</b> caatTTTATCGGGCGTTCAGCTTTAAAAACTGCTTCGGAATTA	1936	catttaatatTTAATAGTCAAAATGGCGATGAAGCATTGGGGAA
	<b>N N L F G R S A L K T A S E L</b>		<b>H L I F N S Q N G D E A F G E</b>
766	atcgctaagaagaatgtgaaaacaagtggcagtgaggtaggaat	1981	aactttactatttcagaaaattaggctttccgaagatttattaagt
	<b>I A K E N V K T S G S E V G N</b>		<b>N F T I S E I R L S E D L L S</b>
811	gtttataattcttaattgtattaacagctctgcaagcaaaagct	2026	ccagaatt <b>gataaattcagatgctt</b> gggttgatctcaggaact
	<b>V Y N F L I V L T A L Q A K A</b>		<b>P E L I N S D A W V G S Q G T</b>
856	ttcttactTTAACAACATGCCGGAATTTATTAGGCTTAGCAGAT	2071	tggat <b>ctcaggaattcactcact</b> attaatagtaattgtgaatgga
	<b>F L T L T T C R K L L G L A D</b>		<b>W I S G N S L T I N S N V N G</b>
901	attgattatactttcattatgaatgaacatttagataagggaaaa	2116	acttttcgacaaaacctttcgttagaagctattcaacttatagt
	<b>I D Y T F I M N E H L D K E K</b>		<b>T F R Q N L S L E S Y S T Y S</b>
946	gaggaatttagagtaaatatccttctacactttctaatactttt	2161	atgaactttaatgtgaatggatttgccaaggtgacagtaagaaat
	<b>E E F R V N I L P T L S N T F</b>		<b>M N F N V N G F A K V T V R N</b>
991	tctaactcctaactatgcaaaagctaaaggaagcaatgaagtgca	2206	tcccgtgaagtattattgaaaaaattatccgcagctttcacc
	<b>S N P N Y A K A K G S N E D A</b>		<b>S R E V L F E K N Y P Q L S P</b>
1036	aagataattgtggaagct <b>aaaccaggatagctttg</b> gttgattt	2251	aaagatattttgaaaaattcacaactgcagccaataataccggg
	<b>K I I V E A K P G Y A L V G F</b>		<b>K D I S E K F T T A A N N T G</b>
1081	gaaatgagcaatgattcaatcacagattaaaagcatatcaggct	2296	ttgtatgtagagctttctcgttttcatcgggtggcgctata <b>aat</b>
	<b>E M S N D S I T V L K A Y Q A</b>		<b>L Y V E L S R F T S S G G A I N</b>
1126	aagctaaaacaagattatcaagttgataaagattcgttatcagaa	2341	<b>Ltccgagatttttcaattaagtaa</b> 2364
	<b>K L K Q D Y Q V D K D S L S E</b>		<b>F R D F S I K *</b>
1171	attgtctatggatgatt <b>ggataaattatgtgcccgga</b> tcaatct		
	<b>I V Y G D M D K L L C P D Q S</b>		

Figura 15. Sequência de nucleotídeos e deduzida de aminoácidos do gene *vip3Ag5* (GenBank: [HQ542193]) obtido a partir do isolado I187 de *B. thuringiensis*. A metionina inicial e o códon de parada estão representados em negrito e em destaque estão os oligonucleotídeos utilizados na estratégia de “primer walking”, onde em verde estão os oligonucleotídeos direto e em amarelo os oligonucleotídeos reverso.

Sequences producing significant alignments:						
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
<a href="#">ACL97352.1</a>	vegetative insecticidal protein [Bacillus thuringiensis]	<a href="#">1497</a>	1497	99%	0.0	99%
<a href="#">CAI43277.1</a>	Isp3c protein [Bacillus thuringiensis]	<a href="#">1377</a>	1377	99%	0.0	91%
<a href="#">AAY88247.1</a>	Vip3D [Bacillus thuringiensis]	<a href="#">1372</a>	1372	99%	0.0	90%
<a href="#">ZP_04075244.1</a>	Vip3Ah1 [Bacillus thuringiensis IBL 200] >emb CAI43275.1  Isp3a 1	<a href="#">1276</a>	1276	99%	0.0	85%
<a href="#">ADJ18214.1</a>	vegetative insecticidal protein [Bacillus thuringiensis serovar japonensis]	<a href="#">1256</a>	1256	99%	0.0	84%

Figura 16. Alinhamento da sequência do gene *vip3Ag5* obtida a partir do isolado I187 de *B. thuringiensis*, realizado dia 19 de setembro de 2010, utilizando o algoritmo BLASTX, da ferramenta BLAST, disponível publicamente na página do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Oito substituições de bases foram detectadas quando as sequências foram alinhadas através do uso do algoritmo BLAST 2Seq da ferramenta BLAST, sendo elas: C (*vip3Ag2*) por A (*vip3Ag5*) na posição da base 789, G (*vip3Ag2*) por A (*vip3Ag5*) na posição da base 1136, C (*vip3Ag2*) por A (*vip3Ag5*) na posição da base 1377, C (*vip3Ag2*) por T (*vip3Ag5*) na posição da base 1395, C (*vip3Ag2*) por T (*vip3Ag5*) na posição da base 1427, C (*vip3Ag2*) por T (*vip3Ag5*) na posição da base 1875, C (*vip3Ag2*) por T (*vip3Ag5*) na posição da base 2206 e T (*vip3Ag2*) por C (*vip3Ag5*) na posição da base 2250 (Figura 17).



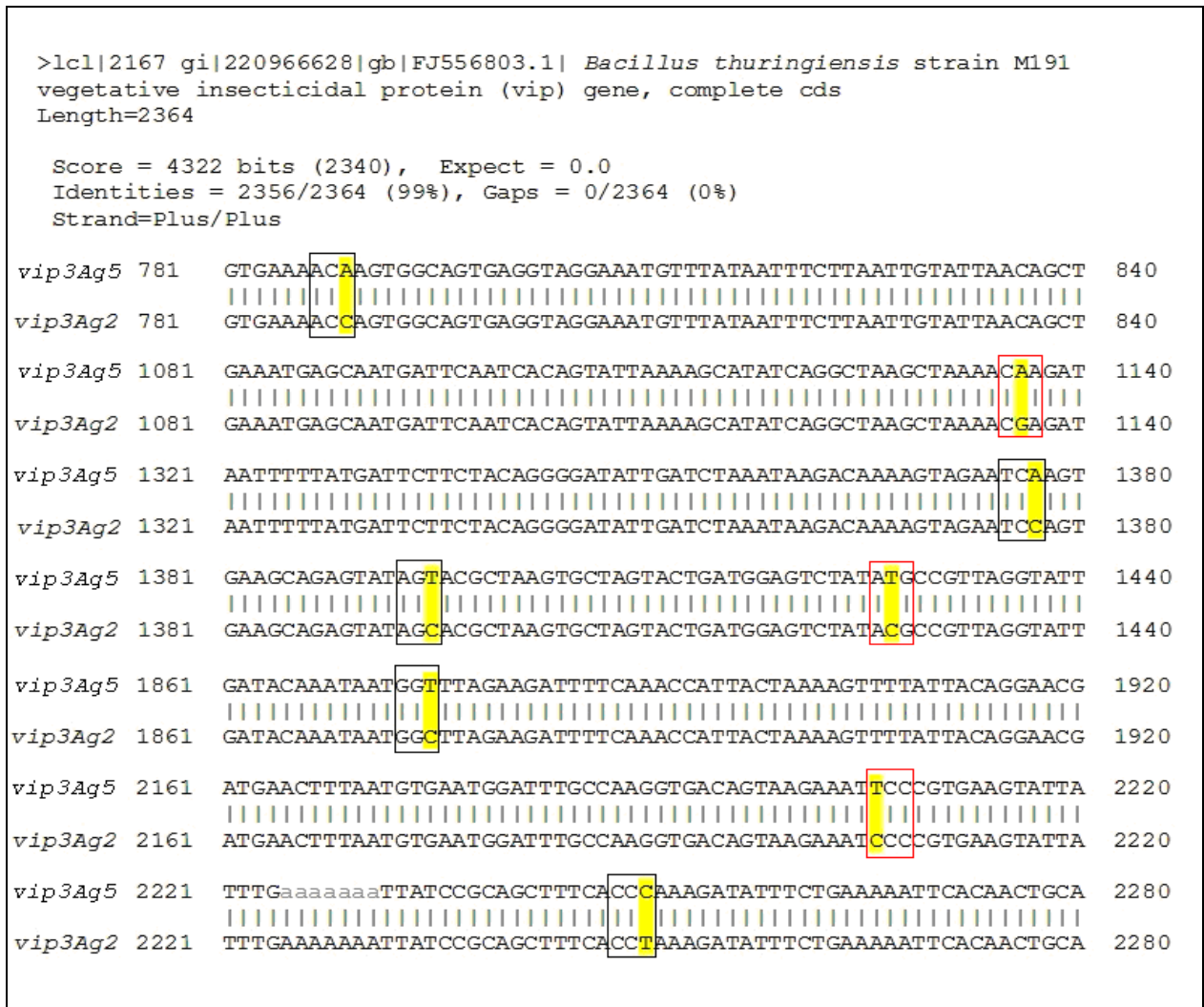


Figura 17. Alinhamento da sequência de nucleotídeos do gene *vip3Ag5* obtido a partir do isolado I187 de *B. thuringiensis* com o gene *vip3Ag2*. Em amarelo estão destacadas as substituições de nucleotídeos. Em preto estão delimitados os códon cujas substituições de nucleotídeos não geraram alterações nos aminoácidos e em vermelho os códon cujas substituições de nucleotídeos geraram alterações nos aminoácidos.

As oito substituições de nucleotídeos resultaram na substituição de três aminoácidos, arginina (*vip3Ag2*) por glutamina (*vip3Ag5*) (CGA por CAA – resíduo 379), treonina (*vip3Ag2*) por metionina (*vip3Ag5*) (ACG por ATG – resíduo 476) e prolina (*vip3Ag2*) por serina (*vip3Ag5*) (CCC por TCC – resíduo 736) (Figura 18)

gb ACL97352.1  vegetative insecticidal protein [ <i>Bacillus thuringiensis</i> ] Length=787			
Score = 1497 bits (3875), Expect = 0.0			
Identities = 784/787 (99%), Positives = 785/787 (99%), Gaps = 0/787 (0%)			
Frame = +1			
<i>vip3Ag5</i>	1	MNKNNTKLSARALPSFIDYFNIGIYGFATGIKDIMNMIFKTDTGGNLTLDLDEILKNQQLLNE	180
<i>vip3Ag2</i>	1	MNKNNTKLSARALPSFIDYFNIGIYGFATGIKDIMNMIFKTDTGGNLTLDLDEILKNQQLLNE	60
<i>vip3Ag5</i>	181	ISGKLDGVNGSLNDLIAQGNLNTELSKEILKIANEQNQVLNDVNNKLNAINTMLHIYLPK	360
<i>vip3Ag2</i>	61	ISGKLDGVNGSLNDLIAQGNLNTELSKEILKIANEQNQVLNDVNNKLNAINTMLHIYLPK	120
<i>vip3Ag5</i>	361	ITSMLNDVMKQNYALSLQIEYLSKQLQEISDKLDVINNVNVLINSTLTEITPAYQRMKYVN	540
<i>vip3Ag2</i>	121	ITSMLNDVMKQNYALSLQIEYLSKQLQEISDKLDVINNVNVLINSTLTEITPAYQRMKYVN	180
<i>vip3Ag5</i>	541	EKFEDLTFATETTLKVKKNSSPADILDELteltelAKSVTKNDVDGFEFYLNTHFDVMVG	720
<i>vip3Ag2</i>	181	EKFEDLTFATETTLKVKKNSSPADILDELTELAKSVTKNDVDGFEFYLNTHFDVMVG	240
<i>vip3Ag5</i>	721	NNLFGRSALKTASELIAKENVKTSQSEVGNVYVNFIVLTLALQAKAFLTLTTCRKLGLAD	900
<i>vip3Ag2</i>	241	NNLFGRSALKTASELIAKENVKTSQSEVGNVYVNFIVLTLALQAKAFLTLTTCRKLGLAD	300
<i>vip3Ag5</i>	901	IDYTFIMNEHLDKEKEEFRVNI LPTLSNTFSNPNYAKAKGSNEDAKI IVEAKPGYALVGF	1080
<i>vip3Ag2</i>	301	IDYTFIMNEHLDKEKEEFRVNI LPTLSNTFSNPNYAKAKGSNEDAKI IVEAKPGYALVGF	360
<i>vip3Ag5</i>	1081	EMSNDISITVLKAYQAKLKQDYQVDKDSLSEIVYGDMDKLLCPDQSEQIYYTNNIAFPNEY	1260
<i>vip3Ag2</i>	361	EMSNDISITVLKAYQAKLK+DYQVDKDSLSEIVYGDMDKLLCPDQSEQIYYTNNIAFPNEY	420
<i>vip3Ag5</i>	1261	VITKIFTFKMNSLRYEATANFYDSSTGDI DLNKTKVESSEAEYSTLSASTDGVYMPGLI	1440
<i>vip3Ag2</i>	421	VITKIFTFKMNSLRYEATANFYDSSTGDI DLNKTKVESSEAEYSTLSASTDGVYTPGLI	480
<i>vip3Ag5</i>	1441	ISETFLTPINGFGIVVDENSKLVNLTCKSYLREVLLATDLSNKETKLI VPPIGFISNIVE	1620
<i>vip3Ag2</i>	481	ISETFLTPINGFGIVVDENSKLVNLTCKSYLREVLLATDLSNKETKLI VPPIGFISNIVE	540
<i>vip3Ag5</i>	1621	ngnlegenlePWKANNKNAYVDHTGGVNGTKALYVHKDGEFSQFIGDKLKSKEFYVIQYI	1800
<i>vip3Ag2</i>	541	NGNLEGENLEPWKANNKNAYVDHTGGVNGTKALYVHKDGEFSQFIGDKLKSKEFYVIQYI	600
<i>vip3Ag5</i>	1801	VKGKASILLKDEKNGDCIYEDTNNGLEDFQITITKSFITGTDSGVLHIFNSQNGDEAFGE	1980
<i>vip3Ag2</i>	601	VKGKASILLKDEKNGDCIYEDTNNGLEDFQITITKSFITGTDSGVLHIFNSQNGDEAFGE	660
<i>vip3Ag5</i>	1981	NFTISEIRLSEDLLSPELINSDAWVGSQGTWISGNSLTINSNVNGTFRQNLSLESYSTYS	2160
<i>vip3Ag2</i>	661	NFTISEIRLSEDLLSPELINSDAWVGSQGTWISGNSLTINSNVNGTFRQNLSLESYSTYS	720
<i>vip3Ag5</i>	2161	MNFNVNGFAKVTVRNPREVLFEKNYPQLSPKDISEKFTTAANNGLYVELSRFTSGGAIN	2340
<i>vip3Ag2</i>	721	MNFNVNGFAKVTVRNPREVLFEKNYPQLSPKDISEKFTTAANNGLYVELSRFTSGGAIN	780
<i>vip3Ag5</i>	2341	FRDFSIK 2361	
<i>vip3Ag2</i>	781	FRDFSIK 787	

Figura 18. Alinhamento da sequência de aminoácidos da proteína Vip3Ag5 obtida a partir do isolado I187 de *B. thuringiensis* com a proteína Vip3Ag2. Em amarelo estão destacadas as substituições de aminoácidos: arginina por glutamina, treonina por metionina e prolina por serina.

A presença de substituições de aminoácidos na proteína Vip3Ag5 obtida a partir do isolado I187, faz com que esta se diferencie das proteínas Vip3Ag agrupadas nos bancos de dados, evidenciando desta forma a presença de uma nova proteína, pertencente à subclasse vip3Ag.

Embora a amplificação do gene *vip3A* completo no isolado I187 de *B. thuringiensis* tenha sido obtida através do uso de oligonucleotídeos iniciadores inespecíficos para a subclasse vip3Ag, foi possível o sequenciamento de um gene pertencente a esta subclasse, pois o iniciador direto utilizado (Vip5) foi elaborado com base na sequência do gene *vip3Aa1*, estando localizado na porção N-terminal deste gene, que é uma região altamente conservada, sendo similar em todas as subclasses vip3A (RANG et al. 2005), já o oligonucleotídeo reverso (V3Ab), foi elaborado com base na sequência do gene *vip3Ab2*, que apresenta a porção C-terminal, onde o oligonucleotídeo foi elaborado, idêntica aos genes *vip3Ag2* e *vip3Ag5*, embora em sua totalidade, estes genes apresentem uma similaridade de apenas 90%, quando realizado o alinhamento dos mesmos através do algoritmo BLAST 2Seq da ferramenta BLAST.

A subclasse vip3Ag compreende até o momento, os genes *vip3Ag1*, *vip3Ag2*, *vip3Ag3*, *vip3Ag4* e *vip3Ag5* cuja sequência foi obtida neste trabalho. A semelhança existente entre eles não pode ser comparada uma vez que apenas a sequência do gene *vip3Ag2* esta disponível publicamente no banco de dados GenBank (AUDTHO et al. 2008). No entanto, também para esta proteína, não há ainda, dados publicados que esclareçam o modo de ação e a toxicidade da mesma frente aos insetos praga.

O gene *vip3Ag1* pertence a uma patente da empresa Syngenta (WO 02/078437), conforme descrito em [http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil\\_Crickmore/Bt/](http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/). Este gene está presente em eventos chamados COT 102 e COT 202 que são linhagens transgênicas de algodão, expressando diferentes proteínas Vip3A em uma mesma linhagem. Estas estão liberadas para testes de campo, desde 2005, nos EUA e Austrália (JACKSON et al. 2007), para o controle de insetos praga da ordem lepidóptera que ataca tal cultura.

Isto se torna então, um indicativo de que a proteína Vip3Ag5 obtida a partir do isolado I187 de *B. thuringiensis* neste estudo, possa apresentar toxicidade a insetos da ordem Lepidoptera, pragas da cultura do algodão.

Segundo FANG et al. (2007) as proteínas Vip3 representam uma das maiores descobertas de toxinas com capacidade inseticida, sendo extremamente relevante a ausência de similaridade nas sequências de aminoácidos destas proteínas com as sequências de aminoácidos das endotoxinas, o que pode resultar no reconhecimento de sítios de união diferentes no epitélio intestinal do inseto alvo, driblando o surgimento de resistência dos mesmos a estas toxinas de primeira geração.

Portanto, a descoberta de novos genes, como os relatados neste trabalho, é de suma importância, uma vez que poderão ser utilizados na produção de eventos piramidados para postergar a resistência de insetos a cultivos de *B. thuringiensis*, contribuindo com o manejo da mesma.

Além disso, estudos envolvendo a toxicidade e o modo de ação destas novas proteínas sobre diferentes espécies de lepidópteros praga, tanto da cultura de algodão, como de outras, deverão ser realizados visando o progresso e o desenvolvimento desta tecnologia.

## 6. CONCLUSÕES

- Por meio do presente trabalho foi possível isolar e sequenciar completamente três genes *vip3A* de *B. thuringiensis*.

- As sequências destes genes foram depositadas nos bancos de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e *Bacillus thuringiensis*: Toxin Nomenclature ([http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil\\_Crickmore/Bt/](http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/)), recebendo as seguintes denominações: gene *vip3Aa43* (GenBank: [HQ594534]), obtido a partir da linhagem padrão *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD1, gene *vip3Aa42* (GenBank: [HQ587048]), obtido a partir da linhagem padrão *B. thuringiensis* var. *tolworthi* HD125 e gene *vip3Ag5* (GenBank: [HQ542193]), obtido a partir do isolado I187 de *B. thuringiensis*.

- Destes três genes, dois codificam proteínas diferentes das descritas nos bancos de dados disponíveis na página do NCBI. A proteína Vip3Aa42, obtida a partir da linhagem padrão HD125 e a proteína Vip3Ag5, a partir do isolado I187.

## 7. REFERÊNCIAS

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J.; Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403 – 410, 1990.

AUDTHO, M.; RATLERDKARN, M.; PROMDONKOY, B.; Vegetative insecticidal protein [*Bacillus thuringiensis*]. GenBank: ACL97352.1. **National Center for Biotechnology Information**. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Submitted in 2008.

AUDTHO, M.; RATLERDKARN, M.; PROMDONKOY, B.; Vip190 [*Bacillus thuringiensis*]. GenBank: ADE06071.1. **National Center for Biotechnology Information**. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Submitted in 2010.

AZAMBUJA, A. O.; PINTO, L. M. N.; DIEHL, E.; FIUZA, L. M.; *Bacillus thuringiensis* obtidos de insetos sociais (*Acromyrmex* sp) coletados em áreas orizícolas. In: VII SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 2001, Poços de Caldas (MG). **Anais**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2001.

AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI JR.; W.; PEREIRA, J. O.; ARAÚJO, W. L.; Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**. Universidad Católica de Valparaíso – Chile, v. 3, n. 1. p. 40-65, 2000.

AZOL, M. S.; **Detecção de polimorfismo por PCR-RFLP no gene *vip3A* em isolados de *Bacillus thuringiensis* e avaliação da proteína Vip3A no controle de *Spodoptera frugiperda***. 2006. 46f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária) Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

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 Microbiol. Lett.**, v. 243, p. 467-472, 2005.

BRAVO, A.; SARABIA, S.; LOPEZ, L.; ONTIVEROS, H.; ABARCA, C.; ORTIZ, A.; ORTIZ, M.; LINA, L.; VILLA-LOBOS, F. J.; GUADALUPE, P.; NUNEZ-VALDEZ, M. E.; SOBERÓN, M.; QUINTERO, R.; Characterization of *cry* genes in mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 64, n. 12, p. 4965 - 4972, 1998.

CAVADOS, C. F. G.; CHAVES, J. Q.; QUEIROZ, M. M. C.; SERRA-FREIRE, N. M.; RABINOVITCH, L. An assesment of the biological activity of *Bacillus thuringiensis* LFB-Fiocruz 907 in *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae). **Israel Journal of Entomology**, Tel Aviv, v. 32, p. 117-123, 1998.

CERÓN, J. **Productos comerciales: nativos y recombinants. En *Bacillus thuringiensis* em el control biológico.** Ed. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colômbia. p, 123 -147, 2004.

COSTA, J. R. V.; ROSSI, J. R.; MARUCCI, S. C.; ALVES, E. C. C.; VOLPE, H. X. L. FERRAUDO, A. S.; LEMOS, M. V. F.; DESIDÉRIO, J. A.; Atividade tóxica de isolados de *Bacillus thuringiensis* a Larvas de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). **Neotropical Entomology**, Piracicaba, v. 39, n. 5, p. 757-766, 2010.

CRICKMORE N.; ZEIGLER D. R.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; BRAVO, A.; DEAN, D. H.; ***Bacillus thuringiensis*: Toxin Nomenclature** Disponível em: <[http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil\\_Crickmore/Bt/](http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/)>. Acesso em: 03 dez. 2010.

DAVOLOS, C. C.; GUIDELLI-THULER, A. M.; ABREU, I. L.; SENA, J. A. D.; LEMOS, M. V. F. *Cry1* genes from *Bacillus thuringiensis*: specificity determination and implications for primer design. **Biotechnology Letters**, Amsterdam, v. 31, n. 12, p. 1891-1897, 2009.

DE MAAGD, R. A.; BRAVO, A.; BERRY, C.; CRICKMORE, N.; SCHNEPF, H. E. Structure, diversity and evolution of protein toxins from espore-forming entomopathogenic bacteria. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 37, p. 409-433, 2003.

DE MAAGD, R. A.; BRAVO, A.; CRICKMORE, N.; How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. **Trends in Genetics**, Amsterdam, v. 17, p. 193-199, 2001.

DIAS, J. M. C. S. Produção e Utilização de Bioinseticidas Bacterianos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 27, p. 59 - 76, 1992.

DIVELY, G. P. Impact of transgenic Vip3A x Cry1Ab lepidopteran-resistant field corn on the nontarget arthropod community. **Environmental Entomology**, College Park, US, v. 34, n. 5, p. 1267-1291, 2005.

DONOVAN, W. P.; DONOVAN, J. C.; ENGLEMAN, J. T. Gene knockout demonstrates that *vip3A* contributes to the pathogenesis of *Bacillus thuringiensis* toward *Agrotis ipsilon* and *Spodoptera exigua*. **J. Invertebr. Pathol.** New York, v.78, n.1, p.45-51, 2001.

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



ESPINASSE, S.; CHAUFAX, J.; BUISSON, C.; PERCHAT, S.; GOHAR, M.; BOURGUET, D.; SANCHIS, V. Occurrence and linkage between secreted insecticidal toxins in natural isolates of *Bacillus thuringiensis*. **Current Microbiology**, New York, v. 47, p. 501-507, 2003.

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 National Academy Science USA**, Washington, v. 93, p. 5389-5394, 1996.

EWING B, GREEN P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II Error probabilities. **Genome Res.** v. 8, p. 186-194, 1998.

EWING B, HILLIER L, WENDL MC, GREEN P Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Res.** 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. **Appl. Environ. Microbiol.** Washington, v. 73, n. 3, p. 956–961, 2007.

FATORETTO, J. C.; SENA, J. A. D.; BARRETO, M. R.; LEMOS, M. V. F.; JUNIOR, A. L. B. Associação de Bioensaios e Caracterização Molecular para Seleção de Novos Isolados de *Bacillus thuringiensis* Efetivos contra *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology**, Piracicaba, v. 36: 737-745, 2007.

FEITELSON, J. S.; PAYNE, J.; KIM, L. *Bacillus thuringiensis*: insect and beyond. **Biotechnology**, v. 10, p. 271-275, 1992.

FERRÉ, J.; REAL, M.D.; VAN RIE, J.; JANSENS, S.; PEFEROEN, M. Resistance to *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide in a field population of *Plutella xylostella* is due to a change in a midgut membrane receptor. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 88, p. 5119-5123, 1991.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D.; **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, p. 23-51, 1998.

FERRY, N.; EDWARDS, M. G.; GATEHOUSE, J.; CAPELL, T.; CHRISTOU, P.; GATEHOUSE, A. M. R. Transgenic plants for insect pest control: a forward looking scientific perspective. **Transgenic Res.**, v. 15, p. 13-19, 2006.

FRUTOS, R.; FEDERICI, B. A.; REVET, B.; BERGOIN, M. Taxonomic studies of *Rickettsiella*, *Rickettsia*, and *Chlamydia* using genomic DNA. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 63, n. 3, p. 294-300, 1994.

GEORGHIOU, G. P. Management of resistance in arthropods. Em: G.P. Georghiou and T. Saito, editors. **Pest Resistance to Pesticides**. New York, Plenum, p. 769 - 792, 1983.

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

GRANERO, F.; BALLESTER, V.; FERRÉ, J. *Bacillus thuringiensis* crystal proteins Cry1Ab and Cry1F share a high affinity binding site in *Plutella xylostella* (L.). **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 224, p. 779-783, 1996.

GRIFFITTS, J. S.; AROIAN, R. V. Many roads to resistance: how invertebrates adapt to Bt toxins. **BioEssays**, v. 27, p. 614-624, 2005.

HAIDER, M. Z.; ELLAR, D. J.; Functional mapping of an entomocidal endotoxin. Single aminoacid changes produced by site-directed mutagenesis influence toxicity a specificity on the protein. **J. Mol. Biol.**, v. 208, p. 183-194, 1989.

HAN, S., J. A.; CRAIG, C. D.; PUTNAM, N. B.; CAROZZI, J. A.; TAINE, R.; Evolution and mechanism from structures of an ADPRibosylating toxin and NAD complex. **Nature Structural Biology** v. 6, p. 932–936, 1999.

HAWTHORNE, D.; Predicting pest evolution predicting insect adaptation to a resistant crop. **J. Econ. Entomol.**, v.91, p.565-571, 1998.

HERRERO, S.; FERRÉ, J. Comparison of different methodologies for binding assays of *Bacillus thuringiensis* toxins to membrane vesicles from insect midgut. **J. Invertebr. Pathol.**, v. 78, p. 275-277, 2001.

HOFMANN, C.; VANDERBRUGGEN, H.; HÖFTE, H.; VAN RIE, J.; JANSSENS, S.; VAN MELLAERT, H.; Specificity of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 85, p. 7844-7848, 1988.

HÖFTE, H.; WHITELEY, H.; Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiol. Rev.**, v. 53, p. 242 - 255, 1989.

JACKSON, R. E.; MARCUS, M. A.; GOULD, F.; BRADLEY JUNIOR, J. R.; VAN DUYN, J. W.; Cross-resistance responses of cry1Ac-selected *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) to the *Bacillus thuringiensis* protein vip3A. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 100, n. 1, p.180-186, 2007.

JURAT-FUENTES, J. L.; ADANG, M. J.; Importance of Cry1  $\delta$ -endotoxin domain II loops for binding specificity in *Heliothis virescens* (L.) **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 67, p. 323-329, 2001.

KNOWLES, B. H.; ELLAR, D. J.; Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins with different insects specificity. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 924, p. 509-518, 1987.

KOLLER, C. N.; BAUER, L. S.; HOLLINGWORTH, R. M.; Characterization of the pH-mediated solubility of *Bacillus thuringiensis* (Bt) cry2Aa2 protein in chloroplasts confers resistance to plants against susceptible and Bt-resistant insects. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 96, p. 1840-1845, 1992.

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 Communication**, Amsterdam, Netherlands, v. 339, n. 4, p. 1043-1047, 2006.

LEE, M. K.; RAJAMOHAN, F.; GOULD, F.; DEAN, D. H.; Resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1A  $\delta$ -endotoxin in a laboratory-selected *Heliothis virescens* strain is related to receptor alteration. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.61, p.3836-3842, 1995.

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 delta-endotoxin. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 69, n. 8, p. 4648-4657, 2003.

LETOWSKI, J.; BRAVO, A.; BROUSSEAU, R.; MASSON, L. Assessment of cry1 Gene Contents of *Bacillus thuringiensis* Strains by Use of DNA Microarrays. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 71, n. 9, p. 5391–5398, 2005.

LIANG, Y.; PATEL, S. S.; DEAN, D. H.; Irreversible binding kinetics of *Bacillus thuringiensis* CryIA  $\delta$ - endotoxins to gypsy moth brush border membrane vesicles is directly correlated to toxicity. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 719-724, 1995.

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. **Letters in Applied Microbiology**. v. 45 p. 432–438, 2007.

LOGUERCIO, L. L.; BARRETO, M. L.; ROCHA, T.; 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**, Oxford, v. 93, n. 2, p. 269-277, 2002.

MACINTOSH, S. C.; STONE, T. B.; SIMS, S. R.; HUNST, P. L.; GREENPLATE, J. T.; MARRONE, P. G.; PERLAK, F. J.; FISCHHOFF, D. A.; FUCHS, R. L.; Specificity and efficacy of purified *Bacillus thuringiensis* proteins against agronomically important insects. **J. Invertbr. Pathol.** St. Louis, v. 56, n. 2, p. 258-266, 1990.

MAIA, A. H.; **Modelagem da evolução da resistência de pragas a toxinas Bt expressas em culturas transgênicas: quantificação de risco utilizando análise de incertezas**. Piracicaba, 2003. 108p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luíz de Queiróz”, Universidade de São Paulo.

MONNERAT, R. G.; BATISTA, A. C.; MEDEIROS, P. T.; MARTINS, E. S.; MELATTI, V. M.; PRAÇA, I. B.; DUMAS, V.F.; MORINAGA, C.; DEMO, C.; GOMES, A. C. M.; FALCÃO, R.; SIQUEIRA, C. B.; SILVA-WERNECK, J. O.; BERRY, C.; Screening of Brazilian *Bacillus thuringiensis* isolates active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatalis*. **Biological Control**. v. 41, n. 3, p. 291-295, 2007.

MONNERAT, R. G.; BRAVO, A.; Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed.). **Controle Biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, v. 3, p. 163-200, 2000.

NEPPL, C. C.; **Management resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins**. Chicago. 35p. Thesis (B.A.) – University of Chicago, 2001.

NESTER, E.; THOMASHOW, L. S.; METZ, M.; GORDON, M.; 100 years of *Bacillus thuringiensis*: A critical Scientific Assessment. **American Society for Microbiology**, 2002.

O'CALLAGHAM, M.; GLARE, T. R.; BURGESS, E .P. J.; MALONE, L. A.; Effects of plants genetically modified for insect resistance on nontarget organisms. **Annual Review of Entomology**. Stanford, US, v. 50, p. 271-292, 2005.

POLANCZYK, R. ALVES, S. B.; *Bacillus thuringiensis*: Uma breve revisão. **Agrociência**, v. VII, p. 1 -10, 2003.

RANG, C.; GIL, P.; NEISNER, N.; VAN RIE, J.; FRUTOS, R.; Novel Vip3-related protein from *Bacillus thuringiensis*. **Appl. Environ. Microbiol.** Washington, US, v. 71, n. 10 p. 6276-6281, 2005.

RENDEIRO, R.; **Uso de defensivos agrícolas naturais pode reduzir danos ao homem e ao meio ambiente**, 2006. Embrapa Amazônia Oriental. Disponível em: <<http://www.agrosoft.org.br/agropag/20055.htm> >. Acesso em: 13 set. 2010.

RICE, W. C.; Specific primers for the detection of Vip3A insecticidal gene within a *Bacillus thuringiensis* collection. **Letters and Applied Microbiology**. v. 28, p. 378-382, 1999.

SAADAOU, I.; AL-THANI, R.; AL-SAAD, F.; HASSAN, N. B.; MESRATI, L. A.; SCHULTZ, P.; ROUIS, S.; JAOUA, S.; Characterization of tunisian *Bacillus thuringiensis* strains with abundance of *kurstaki* subspecies harbouring insecticidal activities against the lepidopteran insect *Ephestia kuehniella*. **Curr Microbiol**, 2010.

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

SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, D.; ZEIGLER, D. R.; DEAN, D. H.; *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiol. Mol. Biol. Review**, Washington, v. 62, n. 3, p. 775–806, 1998.

SEIFINEJAD, A.; SALEHI JOUZANI, G. R.; HOSSEINZADEH, A.; ABDMISHANI, C.; Characterization of Lepidoptera-active *cry* and *vip* genes in Iranian *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Biological Control**, v. 44, n. 2, p. 216-226, 2008.

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*. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 67, n. 12, p. 5855-5858, 2001.

SENA, J. A. D.; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, S.; FERRÉ, J.; Interaction of *Bacillus thuringiensis* Cry1 and Vip3A proteins to *Spodoptera frugiperda* midgut binding sites. **Appl. Environ. Microbiol.** Washington, v. 75, n. 7, p. 2236-2237, 2009.

SENDRA, S. H.; **Los receptores de las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis* y sus implicaciones en el desarrollo de resistencia**. València, España, 2002. 111p. Tesis (Doctoral). Facultat de Ciències Biològiques – Universitat Burjassot.

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

TERRA, W.; FERREIRA, C.; Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. **Comp. Biochem. Physiol.** 109B, 1-62, 1994.

THAMMASITTIRONG, A.; ATTATHOM, T.; PCR-based method for the detection of *cry* genes in local isolates of *Bacillus thuringiensis* from Thailand. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 98, n. 2, p. 121-126, 2008.

THULER, A. M. G.; THULER, R. T.; CÍCERO, E. S.; DE BORTOLI, S. A.; LEMOS, M. V. F.; Estudo da variabilidade gênica em isolados brasileiros de *Bacillus thuringiensis* para emprego no controle biológico de *Plutella xylostella*. **Boletín de Sanidad Vegetal Plagas**, Madrid, v. 33, p. 409-417, 2007.

VALICENTE, F. H.; BARRETO, M. R.; VASCONCELOS, M. J. V.; FIGUEIREDO, J. E. F.; PAIVA, E.; PCR. Identification of *cry1* genes in *Bacillus thuringiensis* strains that are efficient against fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 29, p. 147-153, 2000.

VAN RIE, J.; FERRÉ, J.; Insect resistance to *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. **Entomopathogenic Bacteria**, Amsterdam, Kluwer Academic Publications, p. 219-237, 2000.

VAN RIE, J.; MCGAUGHEY, H. W.; JOHNSON, D. E.; BARNETT, B. D.; VAN MELLAERT, H.; Mechanism of insect resistance to the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. **Science**, v. 247. n. 4938, p. 72 – 74, 1990.



WANG, J.; BOETS, A.; VAN-RIE. J.; REN, G.; Characterization of *cry1*, *cry2*, and *cry9* genes in *Bacillus thuringiensis* isolates from China. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 82, n. 1, p. 63-71, 2003.

WARREN, G. W.; Vegetative insecticidal proteins: novel proteins for control of corn pests, p. 109–121. **Advances in insect control: the role of transgenic plants**. Taylor and Francis, 1997.

YAMAMOTO, T.; DEAN, D. H.; Insecticidal proteins produced by bacteria pathogenic to agriculturas pests. **Entomopathogenic bacteria**. Amsterdam, Kluwer Academic Publications, p. 81-100, 2000.

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. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 63, n. 2, p. 532-536, 1997.