

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**IDENTIFICAÇÃO DE GENES *cry1* EM ISOLADOS DE *Bacillus thuringiensis* E EXPRESSÃO DO GENE *cry1la* EM *Escherichia coli* VISANDO O CONTROLE DE PRAGAS DA CULTURA ALGODOEIRA**

**Vivian Boter Bergamasco**

Bióloga

Jaboticabal - São Paulo - Brasil

Fevereiro de 2009

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**IDENTIFICAÇÃO DE GENES *cry1* EM ISOLADOS DE *Bacillus thuringiensis* E EXPRESSÃO DO GENE *cry1la* EM *Escherichia coli* VISANDO O CONTROLE DE PRAGAS DA CULTURA ALGODOEIRA**

**Vivian Boter Bergamasco**

**Orientador: Prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos**

**Co-orientadora: Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério Sena**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia

Jaboticabal - São Paulo - Brasil

Fevereiro de 2009

B493i Bergamasco, Vivian Boter  
Identificação de genes *cry1* em isolados de *Bacillus thuringiensis*  
e expressão do gene *cry11a* em *Escherichia coli* visando o controle  
de pragas da cultura algodoeira / Vivian Boter Bergamasco. —  
Jaboticabal, 2009  
iii, 48 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2009

Orientador: Manoel Victor Franco Lemos

Banca examinadora: Marcelo Luiz de Laia, Cristina Lacerda Soares  
Petrarolha Silva

Bibliografia

1. Expressão gênica. 2. Genes *cry*. 3. Genética-algodão. I.  
Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 575: 633.51

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

## **DADOS CURRICULARES DA AUTORA**

**VIVIAN BOTER BERGAMASCO** - nascida em Monte Azul Paulista - SP, em 08 de outubro de 1984. Ingressou no curso de Ciências Biológicas na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP Campus de Jaboticabal - SP no ano de 2003. Iniciou no mesmo ano o estágio no Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária da FCAVJ-UNESP, sob a supervisão do Prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos. Foi bolsista de Iniciação Científica FAPESP por dois anos, recebendo o título de Bacharel em Ciências Biológicas, com ênfase em Biotecnologia, em Janeiro de 2007. Em março de 2007 iniciou o mestrado em Microbiologia Agropecuária, cujos resultados estão descritos nesta dissertação.

*À minha família, alicerce da minha vida,  
meus pais Palmiro Bergamasco e Vilma T. Boter Bergamasco  
e meu irmão Vagner Boter Bergamasco,  
pelo amor incondicional.*

*Ao meu namorado Alan J. Homem Facco,  
pela alegria, companheirismo, respeito e  
por todo amor que houver nessa vida...*

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos, pela orientação ao longo desses anos, amizade, ensinamentos profissionais e confiança em mim depositada;

À Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério Sena, pela co-orientação, incentivo, amizade e contribuições valiosas;

Ao Prof. Dr. Marcelo Luiz de Laia pela amizade, colaboração em vários momentos e correções fundamentais neste trabalho;

À Profa. Dra. Cristina L. S. Petrarolha Silva, Profa. Dra. Lúcia M. Carareto Alves e Prof. Dr. Antônio Carlos Monteiro, pelas correções e sugestões no trabalho;

À MSc. Janaína Fernandes Gonçalves, pelos valiosos ensinamentos, paciência, amizade e companheirismo na condução deste trabalho;

À Fernanda A. Sebastião, Larissa S. Martins e Juliana Xavier Cordeiro, pela amizade sincera, apoio em todos os momentos e por todas as conversas;

À equipe do Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada: aos que passaram nele, aos que estão e aos que acabaram de chegar... Suzana, Juliana Costa, Juliana Rossi, Martinha, Lucília, Viviane Vieira, Simone, Michele, Viviani e as estagiárias Lúcia, Rebeca, Emeline, Camila e Ana Rita, pela boa convivência na complicação que é o dia-a-dia de quem trabalha com genética;

À Renata I. D. Tezza e Andressa P. de Oliveira, pela amizade, incentivo, ajuda e longas conversas;

À Profa. Dra. Eliana G. M. Lemos e Dr. João Carlos Campanharo, pelo uso do laboratório e grande apoio na realização de experimentos;

Ao Prof. Dr. Hélio J. Montassier e MSc. Aliandra M. Gibertoni, pelo uso do laboratório, pelo apoio e receptividade;

À equipe do laboratório do Prof. Dr. Ricardo Antonio Polanczyk, pelo apoio nas realizações dos bioensaios;

A todos os funcionários do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária;

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, pela minha formação profissional e pessoal e pela oportunidade de aprimoramento.

Aos docentes do programa de pós-graduação em Microbiologia Agropecuária, que contribuíram para a minha formação acadêmica.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro;

À toda minha família, que de perto ou de longe acompanhou meus passos e me deu apoio;

À todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho e àqueles que, por qualquer razão, não foram mencionados.

## SUMÁRIO

	Página
<b>CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....</b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO 2 - Identificação de genes <i>cry1</i> em isolados de <i>Bacillus thuringiensis</i> e eficiência no controle de <i>Spodoptera frugiperda</i> (Lepidoptera) e <i>Anthonomus grandis</i> (Coleoptera) .....</b>	<b>7</b>
INTRODUÇÃO .....	7
MATERIAL E MÉTODOS.....	9
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	14
CONCLUSÕES .....	19
<b>CAPÍTULO 3 - Expressão de um novo gene <i>cry1la</i> de <i>Bacillus thuringiensis</i> em <i>Escherichia coli</i> com alta atividade contra <i>Spodoptera frugiperda</i> (Lepidoptera) e <i>Anthonomus grandis</i> (Coleoptera).....</b>	<b>20</b>
INTRODUÇÃO .....	20
MATERIAL E MÉTODOS.....	22
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
CONCLUSÕES .....	38
REFERÊNCIAS.....	39



## IDENTIFICAÇÃO DE GENES *cry1* EM ISOLADOS DE *Bacillus thuringiensis* E EXPRESSÃO DO GENE *cry1la* EM *Escherichia coli* VISANDO O CONTROLE DE PRAGAS DA CULTURA ALGODOEIRA

### RESUMO -

O controle de pragas da cultura algodoeira pode ser feito utilizando proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis* e para tal, o presente trabalho testou a atividade inseticida de novos isolados de *B. thuringiensis* frente a larvas neonatas de *Spodoptera frugiperda* e *Anthonomus grandis*, resultando em diversos níveis de mortalidade que foram associados a oito diferentes combinações de genes *cry1* identificados por PCR. O gene *cry1la* (lepidóptero e coleóptero específico) esteve presente na maioria dos isolados, assim como nas linhagens padrões e principalmente nos isolados de maior efetividade para as duas pragas. A partir deste fato, a atividade inseticida de uma nova proteína Cry1la foi avaliada frente a larvas neonatas de *S. frugiperda* e *A. grandis*. O gene *cry1la* completo, previamente obtido por PCR com oligonucleotídeos iniciadores desenhados a partir do gene seqüenciado, foi clonado no vetor pET28a(+), introduzido em *Escherichia coli* BL21(DE3) e expresso por indução com IPTG, confirmando a expressão da proteína Cry1la, com peso molecular de aproximadamente 81 kDa. Os resultados demonstraram a eficiência do sistema bacteriano na expressão da proteína Cry1la de *B. thuringiensis*, a qual foi, posteriormente, utilizada nos bioensaios quantitativos contra larvas de *S. frugiperda* e *A. grandis*, resultando em uma proteína altamente tóxica às duas espécies, característica importante para obtenção de plantas transgênicas de algodão resistentes a estas pragas.

**Palavras-chave:** *Anthonomus grandis*, Bioensaios, Coleoptera, Genes *cry*, Lepidoptera, *Spodoptera frugiperda*

## IDENTIFICATION OF *cry 1* GENES IN *Bacillus thuringiensis* ISOLATES AND EXPRESSION OF *cry1la* GENE IN *Escherichia coli* AIMING THE CONTROL OF COTTON PESTS

### SUMMARY -

The control of cotton pests may be done by using *Bacillus thuringiensis* Cry proteins. For this purpose, the present work tested the insecticidal activity of new *B. thuringiensis* isolates, in neonate larvae of *Spodoptera frugiperda* and *Anthonomus grandis*, resulting in different mortality levels that were associated to eight different combinations of *cry 1* genes identified by PCR. The *cry1la* gene (specific Lepidoptera and Coleoptera) was present in most of the isolates, as well as in the standard strains and mainly in the isolates with higher affectivity for both pests. Considering this, the insecticidal activity of a new Cry1la protein was evaluated against neonate larvae of *S. frugiperda* and *A. grandis*. The complete *cry1la* gene, previously obtained by PCR with oligonucleotide primers that were drawn based on the sequenced gene, was cloned in the vector pET28a(+), introduced in *Escherichia coli* BL21(DE3) and expressed by induction with IPTG, confirming the expression of the Cry1la protein, with molecular weight of approximately 81 kDa. The results demonstrated the bacterial system efficiency on the expression of *B. thuringiensis* Cry1la protein, which was posteriorly, used on the quantitative bioassays against *S. frugiperda* and *A. grandis* larvae, resulting in an extremely toxic protein for both species. This characteristic is exceptionally important for obtaining transgenic cotton plants resistant to these pests.

**Keywords:** *Anthonomus grandis*, Bioassays, Coleoptera, *cry* genes, Lepidoptera, *Spodoptera frugiperda*

## CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

O controle de insetos-praga é um aspecto fundamental na produção agrícola, tanto para grandes como para pequenos produtores (MONNERAT & BRAVO, 1999), o qual está ligado ao uso intenso de insumos visando diminuir as perdas causadas principalmente pela lagarta-do-cartucho ou lagarta militar *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) e pelo bicudo do algodoeiro *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae), cuja praga pode causar dano na cultura algodoeira pode até chegar a 75% (MARTINS et al., 2007). Essa cultura, do algodão, é uma das mais importantes do Brasil, pois gera anualmente cerca de 1,5 bilhões de dólares (MARTINS et al., 2007). Assim, visando a diminuição de danos e perdas de sua produção, o controle de pragas tem sido realizado com inseticidas químicos, que são caros e podem prejudicar a entomofauna benéfica, impedindo que o controle biológico natural atue, favorecendo a ocorrência de resistência, o surgimento de novas pragas e/ou a ressurgência de outras.

Portanto, a busca por métodos alternativos de controle de insetos-praga tem sido realizada com afincos por vários laboratórios ao redor do mundo, devido à necessidade de uma agricultura mais sustentável e desenvolvida com maior preocupação com a preservação do meio ambiente (BOBROWSKI et al., 2003). Nesse sentido, o uso de bioinseticidas formulados a base de *Bacillus thuringiensis* Berliner, vem contribuindo para o início da substituição ou para a redução dos inseticidas químicos em diversas áreas e incentivando novas pesquisas sobre a utilização desta bactéria na agricultura (van FRANKENHUYZEN, 1993).

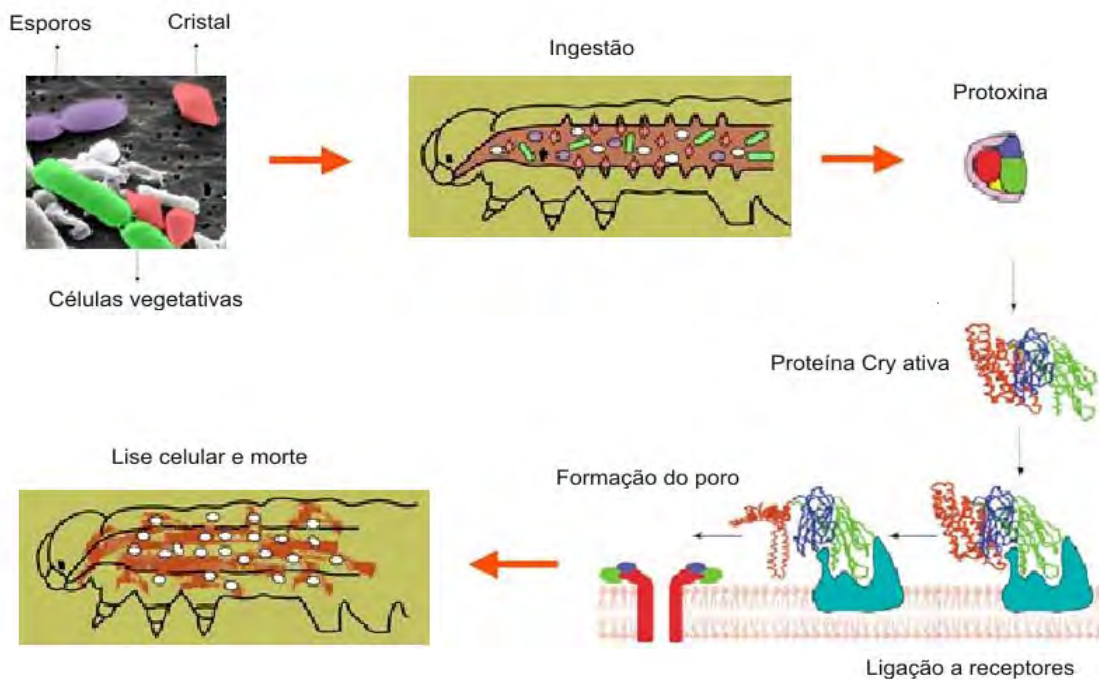
*B. thuringiensis* (Bacillaceae), foi pela primeira vez descrito por Berliner em 1911 quando este pesquisador isolou o bacilo de *Anagasta kuehniella*. Posteriormente, ele o nomeou *B. thuringiensis* em homenagem à província de Thuringia (Alemanha), onde o primeiro inseto infectado foi encontrado (GLARE & O'CALLAGHAM, 2000). É um bacilo Gram-positivo de 1,0 a 1,2 µm de largura por 3,0 a 5,0 µm de comprimento, catalase positivo, aeróbio facultativo, quimio-heterotrófico e possui temperatura ideal de crescimento de aproximadamente 30°C (MORAES & CAPALBO, 1981). É capaz de

formar esporos e de produzir inclusões cristalinas durante a esporulação, que são responsáveis pela atividade tóxica desta espécie (GLARE & O'CALLAGHAM, 2000). *B. thuringiensis* desenvolve-se em condições aeróbicas, em meios artificiais bastante simples e sob certas restrições, como ausência de nutrientes ou acúmulo de metabólitos indesejáveis. O processo de esporulação ocorre durante a fase estacionária, quando a bactéria sintetiza uma grande quantidade de proteínas com atividade inseticida, que são acumuladas formando um corpo de inclusão cristalino, razão pelas quais elas são denominadas Cry ou  $\delta$ -endotoxinas (YAMAMOTO & DEAN, 2000). Estas toxinas tem ação específica à fase larval de espécies de insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Homoptera, Orthoptera e algumas espécies da ordem Acari e dos filos Nematoda e Protozoa (FEITELSEN, 1992).

Segundo a classificação das linhagens da espécie *B. thuringiensis*, a qual é baseada nas propriedades bioquímicas e composição do antígeno flagelar, existem atualmente 69 sorotipos e 13 grupos sub-antigênicos (LECADET et al., 1999). Esta classificação, no entanto, não leva em conta o perfil de toxicidade apresentado. Por isso, novos isolados são estudados e caracterizados de acordo com um grande número de métodos incluindo a morfologia do cristal, a composição protéica destes cristais, a sorotipagem baseada nos antígenos flagelares, bioensaios, perfis plasmidiais e os tipos de gene *cry* presentes em cada isolado, os quais vão determinar a especificidade tóxica dos cristais produzidos pela linhagem (VILAS-BÔAS & LEMOS, 2004). A patogenicidade e a especificidade de uma linhagem é determinada pelos tipos de genes *cry* funcionais que as mesmas possuem. Estes genes codificam as proteínas Cry, que são sintetizadas na forma de protoxinas. A toxicidade das mesmas está associada ao componente N-terminal, enquanto que o componente C-terminal determina a formação da estrutura do cristal (LI et al., 1991).

A ação bioinseticida inicia-se quando a larva do inseto ingere as inclusões de proteínas Cry, que são solubilizadas liberando peptídeos sem atividade inseticida que recebem o nome de protoxinas, que ao serem processadas pelas proteases do intestino médio, principalmente as serina-proteases, tornando-se toxinas ativas. A união das toxinas Cry à membrana epitelial das células do intestino médio se realiza através de

receptores ou sítios de união específicos para cada uma delas (HOFMANN et al., 1988). Esse mecanismo pode levar à formação de poros que aumentam a permeabilidade da membrana, com conseqüente aumento na absorção de água, ruptura e desintegração das células do intestino médio. Pouco tempo após a infecção o inseto pára de se alimentar, entra em paralisia geral e morre por inanição (HOFTE & WHITELEY, 1989; KNOWLES, 1994; COPPING & MENN, 2000). (Figura 1)



**Figura 1.** Exemplificação do mecanismo de ação entomopatogênica de *Bacillus thuringiensis*.

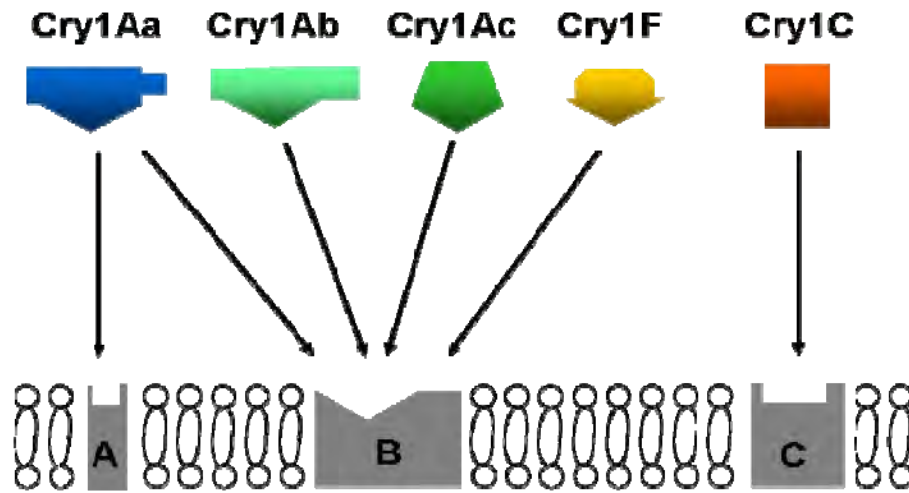
Para a formação do poro, lise celular e morte do inseto há o desenvolvimento de uma série de etapas, desde a união da toxina Cry se une ao seu receptor, que ainda são desconhecidas, ainda que a hipótese de lise coloidesmótica seja aceita (KNOWLES & ELLAR, 1987). Recentemente, algumas variações em relação ao modelo anterior têm sido propostas por vários autores (BRAVO et al., 2004; JURAT-FUENTES

& ADANG, 2006; ZHANG et al., 2005; LEONARDI et al., 2007). O intestino dos insetos suscetíveis geralmente possui um pH elevado, o que evita a germinação dos esporos do patógeno ingeridos. Porém, as  $\delta$ -endotoxinas causam a paralisia do intestino, retendo os esporos e destruindo a parede do intestino. O conteúdo do intestino mistura-se ao da hemolinfa, reduzindo o pH e fornecendo nutrientes para iniciar a germinação dos esporos. O inseto morto serve então como fonte de alimento para o crescimento vegetativo da bactéria (KNOWLES, 1994).

O cristal inseticida de subespécie ou variedade de *B. thuringiensis* pode conter um tipo ou vários tipos de proteínas *Cry*. Isto é devido a presença de uma ou várias cópias de um mesmo gene *cry* ou cópias de diferentes genes cujos produtos formarão um mesmo cristal misto (LERECLUS et al., 1993). Atualmente, existem mais de 400 seqüências de genes *cry* descritas, podendo ser encontrados até sete diferentes genes *cry* em um mesmo isolado de *B. thuringiensis* (MARTINEZ & CABALLERO, 2002). Estes genes podem estar localizados tanto no cromossomo como em grandes plasmídeos (125 kb) (GONZÁLES et al., 1982) ou em ambos. Uma característica comum entre muitas subespécies de *B. thuringiensis* é a presença de um complexo arranjo de plasmídeos. O número e o tipo destes plasmídeos variam consideravelmente entre as linhagens (GONZÁLEZ & CARTON, 1981), mas são independentes do sorotipo e do patótipo. A expressão dos genes *cry* é regulada por dois mecanismos: um deles depende dos fatores sigma específicos da fase da esporulação, onde estão classificados a maioria dos genes *cry*, e o outro, independente do processo de esporulação, como o *cry3*, cujos fatores são típicos da fase de crescimento vegetativo (VALADARES-INGLIS et al., 1998)

Além das toxinas do cristal, várias linhagens de *B. thuringiensis* podem produzir uma série de outras toxinas que podem ou não participar da ação entomopatogênica. A proteína Cyt, de peso molecular de 28 kDa, é uma citolisina de ação inespecífica, sendo acumulada juntamente com as proteínas *Cry* (LERECLUS et al., 1993). Além desta, as proteínas vegetativas *Vip*, que possuem de 80 a 100 kDa, apresentam amplo espectro de hospedeiros (ESTRUCH et al., 1996). Diferentes toxinas se ligam a diferentes receptores em diversas espécies de insetos e com atividade variada, o que explica a

especificidade das mesmas, como exemplificado na Figura 2. Devido à importância do esporo na patogenicidade desta bactéria, a maioria dos produtos comercializados possui os esporos e as toxinas, visando aumentar sua atividade tóxica (COPPING & MENN, 2000).



**Figura 2.** Modelo proposto para a união de algumas toxinas Cry na membrana epitelial do intestino médio de *Plutella xylostella* (Ferré et al., 2005).

Intensos estudos que têm permitido a formulação de hipóteses sobre o papel dos fatores de virulência, como a de LERECLUS et al. (2000) que sugere que durante a fase de esporulação, a regulação do gene *cry* objetiva a produção massiva de proteínas Cry em quantidade suficiente para matar a larva de um inseto alvo. Isto permitiria a germinação dos esporos e a multiplicação das células bacterianas no intestino do inseto. A produção de fatores extracelulares, em resposta à exaustão de nutrientes, capacita a bactéria a danificar e invadir tecidos do hospedeiro, ganhando acesso a fontes alternativas de nutrientes, dando condições favoráveis para um novo ciclo de multiplicação ou crescimento exponencial.

O aumento da importância de *B. thuringiensis* para o controle de insetos na agricultura tem encorajado muitos pesquisadores e companhias a desenvolverem programas de seleção global ou local para encontrar novos isolados com atividade inseticida aumentada. Os isolados obtidos por estes programas têm seus genes *cry* identificados, na maioria das vezes, por meio de tecnologias baseadas na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com iniciadores de especificidade para diferentes genes. Essas técnicas permitem verificar a distribuição desses genes *cry* em coleções naturais de isolados de *B. thuringiensis*, a determinação da persistência da bactéria no ambiente e a predição da atividade tóxica de uma linhagem através das relações filogenéticas entre genes *cry* já sequenciados e caracterizados molecularmente, muitas vezes evidenciando a presença de genes desconhecidos, direcionando os trabalhos para bioensaios (VILAS-BÔAS & LEMOS, 2004; BEN-DOV et al., 1997; BRAVO et al., 1998; CAROZZI et al., 1991), afim de caracterizar o respectivo gene.

Assim, os objetivos do presente estudo foram:

- caracterizar a combinação de genes *cry1*, por PCR, em isolados de *B. thuringiensis*;
- analisar a atividade inseticida destes isolados frente a larvas neonatas de *S. frugiperda* e *A. grandis*;
- correlacionar o haplótipo de genes *cry1* e a efetividade da proteína cristal sobre o controle de larvas;
- clonar o gene *cry1la* em vetor de expressão e expressar em *E. coli*;
- verificar a atividade inseticida da proteína Cry1la expressa frente a larvas neonatas de *S. frugiperda* e *A. grandis*.



## **CAPÍTULO 2 - Identificação de genes *cry1* em isolados brasileiros de *Bacillus thuringiensis* e eficiência no controle de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) e *Anthonomus grandis* (Coleoptera)**

### **INTRODUÇÃO**

O aumento da produção agrícola para atender à crescente demanda por alimentos tem impactos diretos sobre o agroecossistema, pois está ligado ao uso intenso de insumos químicos visando diminuir as perdas causadas principalmente pelos insetos-praga, como a *Spodoptera frugiperda* e *Anthonomus grandis*. *S. frugiperda* é uma espécie polífaga que ataca diversas culturas economicamente importantes em vários países, sendo encontrada no Brasil como praga de muitas culturas (MONNERAT et al., 2007). *A. grandis* é uma das pragas mais importante do algodão nas Américas (BUSOLI et al., 1994; GALLO et al., 2002) com grande poder de destruição e de difícil controle. Caso não seja controlado, o dano na cultura algodoeira pode chegar a 75% (MARTINS et al., 2007).

Com o desenvolvimento de resistência das pragas e a crescente preocupação com a saúde humana e com a geração de resíduos químicos, a utilização de agentes entomopatogênicos como o *Bacillus thuringiensis* é uma atrativa alternativa para controlar estas pragas economicamente importantes. Principalmente devido a sua alta especificidade, o uso do *B. thuringiensis* não causa danos aos organismos não alvos e nem à fauna em geral (ESCUDEIRO, 2006). Sua ação ocorre devido a produção de proteínas Cry ou  $\delta$ -endotoxinas codificadas pelos genes *cry*.

Diferentes combinações de genes *cry* caracterizam perfis de toxicidade distintos, devido à contribuição de cada um deles para diferentes níveis de toxicidade. A patogenicidade e a especificidade de uma linhagem é determinada pelos tipos de genes *cry* funcionais que as mesmas possuem. Algumas destas proteínas apresentam toxicidade a mais de uma ordem de insetos, como por exemplo, as Cry1I tóxicas às

ordens Lepidoptera e Coleoptera (TAILOR et al., 1992) e Cry1B que é ativa para as ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera (ZHONG et al., 2000, PRAÇA et al., 2004).

Atualmente existem mais de 400 diferentes genes *cry* (CRICKMORE et al., 2008), e a identificação dos tipos e subtipos de genes *cry* contidos numa nova linhagem de *B. thuringiensis* pode ser feita por meio da técnica da Reação de Polimerase em Cadeia (PCR), utilizada em diversos trabalhos, como MONNERAT et al. (2007), THAMMASITTIRONG & ATTATHOM (2008) e SEIFINEJAD et al. (2008), em busca de novos isolados com potenciais entomopatogênicos. A PCR tem sido usada para caracterização de genes que codificam proteína Cry e para a análise de coleções de *B. thuringiensis*. Esta técnica foi introduzida por CAROZZI et al. (1991) para identificar genes *cry*, tornando-se uma eficiente estratégia para esta finalidade. Os alvos podem ser atingidos por meio de iniciadores específicos ou gerais sintetizados a partir de seqüências de genes *cry* já conhecidas. Deste modo, é possível utilizar oligonucleotídeos iniciadores específicos para cada subtipo de gene *cry*, previamente descrito, para identificar genes contidos em outras linhagens e/ou isolados, aumentando as chances de identificar novos isolados de *B. thuringiensis* com potencialidades entomopatogênicas diferentes das atualmente conhecidas. Esta é uma das prioridades em vários centros de pesquisa, assim como a comprovação da eficiência desses novos isolados, que podem ser utilizados para a geração de bioinseticidas mais efetivos no controle de pragas.

Nesse sentido, o presente trabalho teve por objetivo analisar a atividade inseticida de isolados de *B. thuringiensis* frente a larvas neonatas de *S. frugiperda* e *A. grandis* comparados ao conteúdo de genes *cry1* identificados por meio de PCR e correlacionar o conteúdo de genes *cry1* e a efetividade da proteína cristal sobre o controle de larvas.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Linhagens de *Bacillus thuringiensis*

Os sete isolados de *B. thuringiensis* utilizados neste projeto foram provenientes de amostras de solo de fazendas da cidade de São Paulo-SP. Foram utilizadas como controle duas linhagens-padrão que são efetivos contra insetos da ordem Lepidoptera (*B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD1 e *B. thuringiensis* var. *aizawai* HD137) e uma outra linhagem-padrão efetiva contra insetos da ordem Coleoptera (*B. thuringiensis* var. *tenebrionis*). Todas as amostras foram mantidas estocadas na forma de esporos impregnados em fita de papel filtro, em tubos criogênicos com água Milli-Q estéril em temperatura controlada em BOD a 10°C. Tanto os isolados quanto os padrões são mantidas na coleção do Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA) do Depto. de Biologia Aplicada à Agropecuária da FCAV/UNESP – Jaboticabal-SP.

### Condições de cultivo e extração do DNA total

Isolados e linhagens padrão foram cultivados em placas de Petri contendo meio Ágar Nutriente (GORDON et al. 1973), a 30°C por 16 h. Colônias isoladas das linhagens foram inoculadas em 50 ml de meio líquido BHI (Brain Heart Infusion) da Biobrás® e incubadas sob agitação de 200 rpm a 30°C, durante 4 h e 30 min.

O DNA total das amostras de *B. thuringiensis* foi extraído conforme o protocolo de MARMUR (1961), com modificações. A cultura de *B. thuringiensis* proveniente de 50 ml de meio BHI foi centrifugada por 10 min, a 7.400 x *g* a 20°C. O precipitado bacteriano, em média de 0,5 g, obtido por centrifugação, foi ressuspenso em 6 ml de solução salina [0,15 M NaCl e 0,1 M EDTA (pH 8,0)], adicionado de 0,6 ml de lisozima e incubado por 1 h a 37°C. Após, foram adicionados 500 µl de SDS 25% agitando-se

suavemente a preparação. Em seguida, foi acrescentado acetato de sódio 2,5 M até a concentração final de 1 M. A desproteinização foi feita utilizando-se de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1 v/v) e o sobrenadante coletado após a centrifugação e, em seguida, adicionados 2 volumes de etanol absoluto gelado. O precipitado obtido por centrifugação foi dissolvido em TE [ 10 mM Tris-HCl (pH 7,4), 1 mM EDTA] no qual foi adicionado 25 µl de RNase (10 mg/ml) e incubado por 30 min a 37°C. Posteriormente, foi submetido novamente a um tratamento com clorofórmio/álcool isoamílico (24:1v/v), e as amostras de DNA precipitadas com 2 volumes de etanol absoluto gelado. As amostras de DNA foram ressuspensas em TE e estocadas a -20°C.

As amostras de DNA foram quantificadas em espectrofotômetro (BECKMAN, modelo DU-640B), medindo-se a absorvância em contraste com uma amostra de TE, nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm, sendo calculada a relação 260/280 nm (SAMBROOK & RUSSEL, 2001). As amostras foram diluídas a uma concentração de 10 ng/µl. Para a análise da qualidade das amostras, uma alíquota de 8 µl das mesmas foi aplicada em gel de agarose 0,8% contendo brometo de etídeo e submetida à eletroforese com tampão TBE (89 mM de Tris, 89 mM de ácido bórico e 2,5 mM de EDTA pH 8,2), a 90 V por 1h 30 min. As bandas de DNA de cada linhagem foram visualizadas e documentadas em um fotodocumentador modelo GEL DOC 2000 (Bio-Rad).

### **Amplificação de genes *cry1* por PCR**

Para a determinação do conteúdo de genes *cry1* nos isolados foram utilizados sete pares de iniciadores específicos obtidos da coleção do LGBBA (Tabela 1), elaborados a partir das seqüências correspondentes à cada uma das subclasses da família do gene *cry1* que são responsáveis pela toxicidade de larvas da ordem Lepidoptera, obedecendo à lista de nomenclaturas das proteínas Cry de *B. thuringiensis* disponível no site [http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil\\_Crickmore/Bt/toxins2.html](http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/toxins2.html), o qual é atualizado constantemente.

As reações de amplificação para os pares de iniciadores utilizados foram conduzidas em um volume total de 20  $\mu$ l contendo: 30 ng de DNA total, 250  $\mu$ M de uma solução de dNTPs; 2,0 mM de  $MgCl_2$ ; 0,2  $\mu$ M de cada um dos iniciadores; 1,0 U da enzima *Taq* DNA polimerase; solução tampão para reação de PCR (1X) e água bidestilada previamente esterilizada (q.s.p. 20  $\mu$ l).

**Tabela 1.** Seqüências nucleotídicas dos iniciadores utilizados para a amplificação de genes *cry1* de *B. thuringiensis*

Genes	Tamanho do produto amplificado	Seqüências
<b><i>cry1Aa</i></b>	426 pb	D 5' TATTTCCCTTGTCGCTAACGC 3' R 5' CCAAACACTGAAACATCTCTC 3'
<b><i>cry1Ab</i></b>	799 pb	D 5' GAGATGTTTTAGTGTGGAC 3' R 5' GTCCCGTCAAGAACAGATAG 3'
<b><i>cry1Ac</i></b>	712 pb	D 5' GGTGCTGGATTTGTGTTAGG 3' R 5' TTCTTTCTATGCCCTGAGCC 3'
<b><i>cry1B</i></b>	465 pb	D 5' AACAAACGAGAGATTATTCCG 3' R 5' CGTTCTGTTGTTTCTGGTGG 3'
<b><i>cry1C</i></b>	393 pb	D 5' TGGTCAACTAACAAGGGAAG 3' R 5' TCTACTCCTTCAACACCACG 3'
<b><i>cry1D</i></b>	670 pb	D 5' GAAGGGAAGGAAATACAGAGC 3' R 5' GTTATTGGAGTGAAGAGTGTG 3'
<b><i>cry1la</i></b>	827 pb	D 5' ATGTAGAGCCGTTTGTAGTG 3' R 5' TATGGCAGAGAACGAAGGTG 3'

D= direto

R= reverso

As reações foram submetidas a um processo de amplificação, em aparelho termociclador (PTC-100 “Programmable Thermal Controller” - MJ Research, inc.), equipado com circuito “Hot Bonnet”, onde foi utilizado o seguinte programa: um passo único de desnaturação de 5 min a 92°C e 30 ciclos consistindo de um ciclo de desnaturação a 92°C por 1 min; pareamento a 50°C por 1 min e extensão a 72°C por 1 min, e ao final dos ciclos uma extensão extra a 72°C por 10 min. Ao fim de cada programa foi adicionado um passo único para manutenção da amostra a 10°C até a retirada dos tubos do termociclador.

Após as amplificações, 2 µl de tampão de amostra (0,5% de azul de bromofenol em glicerol 50%) foram adicionados a um volume de 15 µl de cada amostra e aplicados em géis de agarose 1,5% (p:v), contendo brometo de etídeo (0,5 µg/ml) e submetidos a eletroforese horizontal por 2 horas a uma corrente elétrica de 75 V, conduzida em tampão TEB 1X (Tris 89 mM, EDTA 2,5 mM e Acido Bórico 89 mM com pH 8,3), também adicionado de brometo de etídeo (0,5 µg/ml). Em todas as eletroforeses realizadas, adotou-se o emprego de uma amostra de DNA com fragmentos de tamanhos conhecidos, múltiplos de 1 kb (1 kb DNA Ladder®), produzida pela Fermentas, a qual serviu como referência de migração eletroforética para verificação da massa molecular dos fragmentos obtidos nas reações de amplificação. Os géis de agarose foram visualizados sob luz UV e documentados em um equipamento fotodocumentador (GEL DOC 2000 - Bio-Rad).

## **Bioensaios**

Os bioensaios foram conduzidos no Centro de Ciências Agrárias – Universidade Federal do Espírito Santo, em Alegre-ES. Os isolados e as linhagens padrão de *B. thuringiensis* foram cultivados em placas de Petri contendo meio de cultura Nutriente Ágar a 30°C por 48 h e o conteúdo das placas foi raspado, transferido para tubos tipo Falcon (50 ml) e o volume completado para 20 ml de água destilada. Estes tubos foram centrifugados a 1300 x g por 30 min, onde se retirou a cada centrifugação o material

suspensão, adicionando-se novamente 20 ml de água. Após três lavagens com 20 ml de água destilada adicionaram-se 10 ml de água bidestilada para a ressuspensão dos esporos. Após homogeneização em vortex, foi feita a padronização dos esporos para  $3 \times 10^8$  esporos/ml na leitura em câmara de Neubauer. Foi utilizada uma solução de esporos/cristais para cada isolado.

Nos bioensaios com *S. frugiperda*, as lagartas foram alimentadas com dieta artificial semi-sólida (BARRETO et al., 1999). A dieta foi colocada em forma de alumínio esterilizada, permanecendo no fluxo laminar até solidificar. Depois de cortada em cubos de 1 cm<sup>3</sup>, foi esterilizada em luz germicida. Nos bioensaios, esses cubos foram banhados com 1 ml de solução de esporos/cristais de cada isolado. Cada cubo foi inserido em um gerbox (2,0 X 6,0 cm), onde foram colocadas 10 larvas de primeiro instar de *S. frugiperda*. O delineamento foi inteiramente casualizado, com 10 tratamentos (isolados e testemunha) e 5 repetições, sendo que para a testemunha utilizou-se 1 ml de água bidestilada. Os tratamentos foram acondicionados em câmara climatizada ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ), fotofase (14 h) e umidade relativa ( $70 \pm 5\%$ ). Os tratamentos foram avaliados até 7 dias após a inoculação (POLANCZYK et al., 2000) e a seguir foi feita a quantificação de lagartas mortas pela ação do *B. thuringiensis*, cuja porcentagem de mortalidade de cada tratamento foi calculada.

Nos bioensaios com *A. grandis* as larvas neonatas também foram alimentadas com dieta artificial (MARTINS et al., 2007). O bioensaio foi realizado incorporando-se 1 ml da solução de esporos em 35 ml de dieta artificial, vertida em placas de Petri. Após solidificação da dieta, em sua superfície foram feitos 15 furos de aproximadamente 2 mm, onde colocaram-se larvas neonatas (uma por furo). Foi realizado um delineamento inteiramente casualizado, com 10 tratamentos (isolados e testemunha) e 4 repetições, sendo que para a testemunha utilizou-se água destilada. Os tratamentos foram acondicionados em câmara climatizada ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ), fotofase (14 h) e umidade relativa ( $70 \pm 10\%$ ). Os tratamentos foram avaliados após 7 dias da inoculação (PRAÇA et al., 2004) e a seguir foi feita a quantificação de lagartas mortas pela ação do *B. thuringiensis*, cuja porcentagem de mortalidade de cada tratamento foi calculada.

Para a análise estatística nos bioensaios, os dados de porcentagens de

mortalidade foram submetidos à análise de variância, cujo modelo matemático proposto inclui o efeito fixo de linhagens. Foram verificadas as pressuposições de normalidade dos resíduos e homogeneidade de variância dos grupos (linhagens). Testes de comparação de médias entre as linhagens foram realizados após verificado o efeito do grupo sobre a porcentagem de mortalidade. Para a comparação das médias, foi utilizado o teste de Tukey a 5%, para estabelecer a diferença mínima significativa entre as médias de mortalidade das linhagens, pelo Sistema de Análise Estatística (SANEST) (Zonta & Machado, 1987).

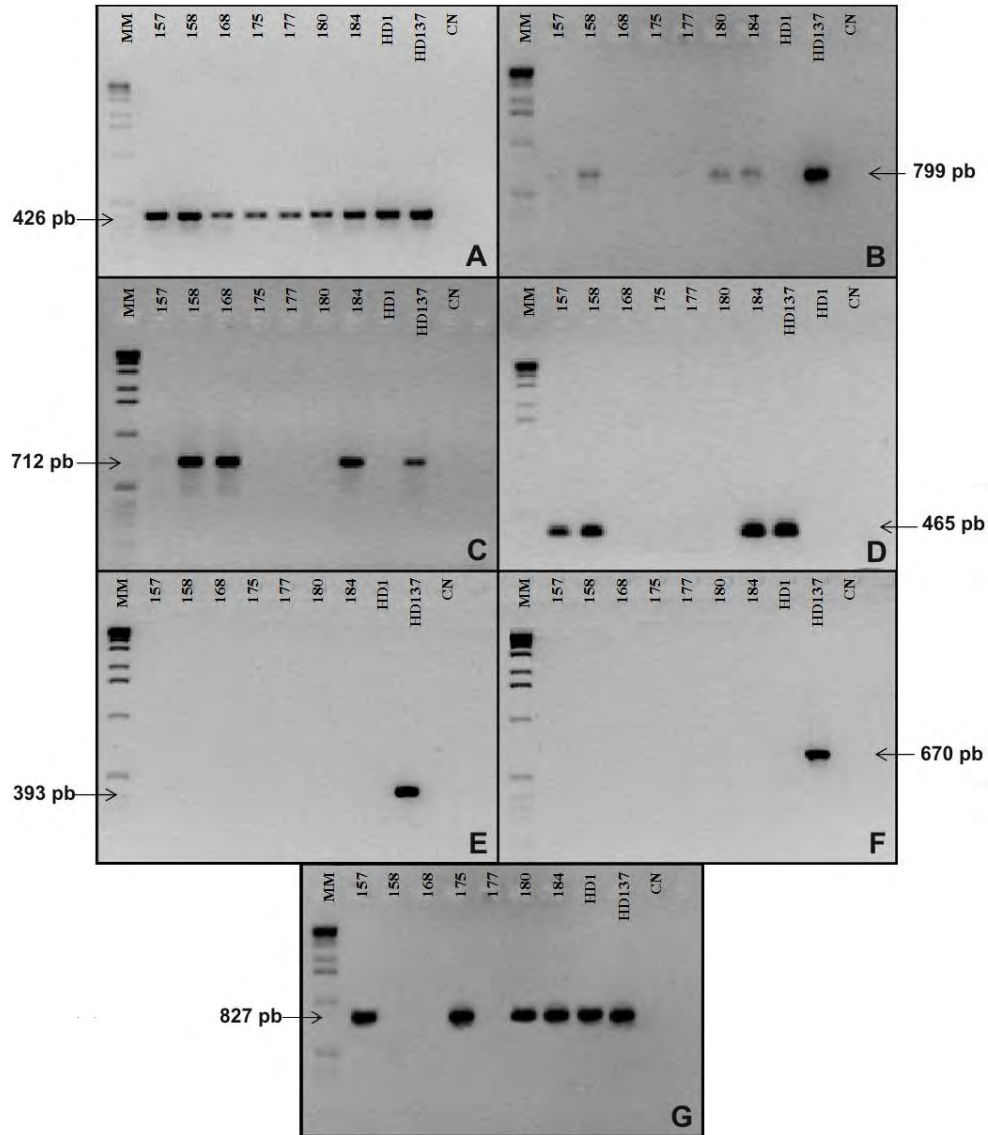
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A determinação da combinação de genes *cry1* nos isolados permite prever a atividade inseticida dos mesmos. Todos os amplicons obtidos com oligonucleotídeos iniciadores específicos foram analisados, em gel de agarose, pela ausência e presença da banda com tamanho molecular esperado (Figura 1). Os genes identificados em cada isolado são mostrados na Tabela 2. Identificou-se diversas combinações de genes *cry1*, e nenhum dos isolados amplificou para os genes *cry1C* e *cry1D*, havendo apenas amplificação na linhagem padrão para esses genes (*B. thuringiensis* var. *aizawai* HD137), que é uma linhagem considerada lepidóptero específica.

Pela análise da Tabela 2, nos bioensaios com *S. frugiperda* os padrões *B. thuringiensis* var. HD1, *B. thuringiensis* var. HD137 e os isolados 157, 158, 184 e 168 não diferenciaram estatisticamente um do outro, sendo que os cinco primeiros causaram 100% de mortalidade. Todos foram patogênicos para *S. frugiperda* sendo que o 177 não se diferenciou da testemunha. Nos bioensaios com *A. grandis* (Tabela 2), todos foram patogênicos. O controle positivo *B. thuringiensis* var. *tenebriones* e os isolados 184, 180, 157, 175 não diferenciaram estatisticamente um do outro, sendo os que causaram maiores porcentagens de mortalidade, de 83,33 a 93,33%. Dentre aqueles isolados (163, 177 e 158) que causaram mortalidades medianas (de 41,66 a



75%), não houve diferença estatisticamente significativa dos padrões *B. thuringiensis* var. HD1 e *B. thuringiensis* var. HD137.



**Figura 1.** Amplificação do material genético correspondente às subclasses do gene *cry1*. **A:** *cry1Aa*, **B:** *cry1Ab*, **C:** *cry1Ac*, **D:** *cry1B*, **E:** *cry1C*, **F:** *cry1D*, **G:** *cry1Ia*. Os números nas canaletas se referem às linhagens de *Bacillus thuringiensis* analisadas. MM: marcador de tamanho molecular 1kb DNA ladder®. HD1 e HD137: controles positivos para Lepidoptera. CN: controle negativo.

**Tabela 2.** Genes *cry1* identificados nos isolados e linhagens de *Bacillus thuringiensis* e suas respectivas mortalidades em bioensaios contra larvas neonatas de *Spodoptera frugiperda* e *Anthonomus grandis*

Isolados / Linhagens	Genes <i>cry1</i> identificados	% de mortalidade $\pm$ EP em <i>Spodoptera frugiperda</i>	% de mortalidade $\pm$ EP em <i>Anthonomus grandis</i>
157	<i>cry1Aa, cry1B, cry1Ia</i>	100,00 $\pm$ 0,00 A	88,33 $\pm$ 9,35 A
158	<i>cry1Aa, cry1Ab, cry1Ac, cry1B</i>	100,00 $\pm$ 0,00 A	65,00 $\pm$ 5,67 B
168	<i>cry1Aa, cry1Ac</i>	80,00 $\pm$ 5,48 A	75,00 $\pm$ 5,56 B
175	<i>cry1Aa, cry1Ia</i>	54,00 $\pm$ 10,77 BC	86,33 $\pm$ 7,18 A
177	<i>cry1Aa</i>	44,00 $\pm$ 6,78 CD	73,33 $\pm$ 5,43 B
180	<i>cry1Aa, cry1Ab, cry1Ia</i>	78,00 $\pm$ 8,00 AB	98,33 $\pm$ 8,20 A
184	<i>cry1Aa, cry1Ab, cry1Ac, cry1B, cry1Ia</i>	100,00 $\pm$ 0,00 A	98,33 $\pm$ 8,20 A
<b>B.t. var. aizawai HD137</b>	<i>cry1Aa, cry1B, cry1C, cry1D, cry1Ia</i>	100,00 $\pm$ 0,00 A	68,33 $\pm$ 6,84 B
<b>B.t. var. kurstaki HD1</b>	<i>cry1Aa, cry1Ab, cry1Ac, cry1B, cry1Ia</i>	100,00 $\pm$ 0,00 A	41,66 $\pm$ 6,97 B
<b>B.t. var. tenebrionis</b>	—	—	83,33 $\pm$ 8,58 A
<b>Testemunha</b>	—	0,00 $\pm$ 0,00 D	5,00 $\pm$ 2,44 C

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

Na comparação dos genes *cry1* identificados nos isolados e linhagens-padrão com suas médias de mortalidade, identificou-se oito diferentes combinações de genes que, nos bioensaios, demonstraram perfis de toxicidades distintos. Com relação aos bioensaios com *S. frugiperda*, nos isolados que apresentaram menores médias de mortalidade, foi identificado apenas o gene *cry1Aa* no isolado 177 e no 175 o *cry1Aa* e o *cry1Ia*. Naqueles que apresentaram mortalidade medianas, dois genes foram identificados, sendo um deles o gene *cry1Aa* e o outro *cry1Ab* ou o *cry1Ac* ou mesmo o gene *cry1Ia*. Já naqueles mais efetivos, assim como os padrões, com médias de mortalidade altas, notou-se a presença de três ou mais genes *cry1*. Nos bioensaios com *A. grandis*, a mortalidade também foi influenciada pela diversidade de genes *cry1* e principalmente pela presença do gene *cry1Ia*. O gene *cry1Ia* (lepidóptero e coleóptero específico) esteve presente em 57% dos isolados e principalmente naqueles de maior efetividade para as duas pragas (isolados 157, 180 e 184), assim como nas linhagens-padrão. Este fato desperta grande interesse no estudo da ação individual da proteína Cry1Ia, que pode ser feita após o isolamento, clonagem e expressão em *E. coli*.

Neste trabalho foi avaliada a presença de diferentes genes *cry1* nos isolados estudados, obtidos pela análise de PCR. Contudo, a presença de um gene específico não indica apuradamente sua atividade tóxica, assim, isso não significa que os mesmos estão sendo expressos, eles podem estar inativos, sob o controle de um promotor ineficiente ou em uma baixa taxa para expressar completamente sua ação biopesticida. Mas, a identificação do gene por meio desta técnica é um forte indício de que estes isolados poderão ser empregados em programas de controle biológico contra diferentes pragas.

Geralmente, o tipo do gene *cry* presente em um isolado correlaciona a sua especificidade, logo, a identificação do gene em um isolado pode ser utilizada para prever seu potencial ao biocontrole, bem como a sua especificidade (WANG et al., 2003). A técnica de PCR com iniciadores específicos foi utilizada por vários autores (VILAS-BÔAS & LEMOS, 2004; SAUKA et al., 2006; SUN et al, 2008) com diversos fins, como a diferenciação dos isolados de *B. thuringiensis* de isolados de *Bacillus cereus*, a verificação da diversidade genética de genes *cry* e até a identificação de genes *cry* de

interesse ou mesmo novos genes. Estes trabalhos demonstram a importância do uso da técnica de PCR na caracterização de isolados de *B. thuringiensis* previamente aos testes de atividade tóxica frente aos diferentes insetos de mesma ou de outras ordens. A identificação dos diversos genes *cry1* e sua relação com a concentração letal média (CL<sub>50</sub>) em bioensaios com *S. frugiperda* foi demonstrado por CERON et al. (1994), onde se utilizou a técnica de PCR multiplex para identificar os genes.

Comparando-se os genes *cry1* identificados nos isolados e suas médias de mortalidade, identificaram-se variadas combinações de genes nos isolados analisados que, nos bioensaios, demonstraram perfis de toxicidades distintos. A presença dos genes *cry1Aa*, *cry1B* e *cry1Ia* nos isolados com maiores níveis de mortalidade pode indicar uma interação sinérgica entre esses genes de modo a formar proteínas com maior toxicidade a *S. frugiperda* e a *A. grandis*, sendo essa característica promissora para uso contra essa praga. Segundo XUE et al. (2005), a interação sinérgica entre as toxinas Cry1Aa e Cry1C exibiu uma maior toxicidade a *Spodoptera exigua* e *Helicoverpa armigera* do que as mesmas toxinas isoladas.

Um dos problemas do uso de *B. thuringiensis* é seu espectro de ação limitado quando comparado aos inseticidas químicos. Este é um fator limitante já que as culturas agrícolas são atacadas simultaneamente por diferentes pragas e, às vezes, por insetos de diferentes ordens. Uma importante característica encontrada neste estudo é a presença de isolados que contém genes com dupla especificidade, como o *cry1B* e o *cry1Ia*. Isso mostra que, potencialmente, alguns isolados de *B. thuringiensis* podem ser selecionados para desenvolver biopesticidas ou mesmo plantas transgênicas que tem ação a mais de um tipo de insetos-praga em uma cultura. No presente trabalho, o gene *cry1Ia* estava presente na maioria dos isolados com grande efetividade para as duas pragas, principalmente nos isolados 157 e 184, o que o tornou de grande interesse no estudo da ação individual da proteína Cry1Ia em bioensaios, que pode ser feita após a expressão em *Escherichia coli*.

## CONCLUSÕES

- A determinação do conteúdo de genes *cry1* nos isolados permitiu prever a atividade inseticida dos mesmos.
- Os diferentes níveis de toxicidade estão relacionados ao conteúdo de diferentes genes *cry1* e ao possível sinergismo entre eles para a expressão de um maior nível de toxicidade das proteínas Cry.
- A presença do conjunto de genes *cry1Aa*, *cry1B* e *cry1Ia* em alguns dos isolados com maiores níveis de mortalidade a *S. frugiperda* e a *A. grandis* pode indicar uma interação sinérgica entre esses genes, de modo a formar proteínas com maior toxicidade às duas pragas.
- Os resultados obtidos no presente trabalho fazem com que os isolados 157, 180 e 184, os mais efetivos tanto para *A. grandis* quanto para *S. frugiperda*, contendo o gene *cry1Ia*, sejam os mais promissores para o uso no combate a estas pragas.

### **CAPITULO 3 - Expressão de um novo gene *cry1la* de *Bacillus thuringiensis* em *Escherichia coli* com alta atividade contra *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) e *Anthonomus grandis* (Coleoptera)**

#### **INTRODUÇÃO**

Grandes culturas comerciais como algodão, milho, soja, cana-de-açúcar, entre outras, requerem o uso intensivo de inseticidas para o controle de pragas, com gastos estimados de 3 a 5 bilhões de dólares por ano, sendo 645 milhões somente nas plantações de algodão (SANTOS et al., 2003), especialmente para o controle de insetos da ordem Lepidoptera e Coleoptera. Dentre as pragas mais devastadoras na cultura do algodão estão a lagarta-do-cartucho ou lagarta militar *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), que ataca diversas culturas economicamente importantes em vários países, e o bicudo do algodoeiro *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae), uma das pragas mais importante do algodão nas Américas (GROSSI-DE-SÁ et al., 2007).

O controle dessas pragas tem sido realizado com inseticidas químicos, que além do custo elevado, possuem altos riscos de toxicidade e de impacto ambiental. Os avanços científicos e tecnológicos, obtidos pela recente introdução de ferramentas da biologia molecular, foram fatores que impulsionaram a adoção e o uso do controle biológico como uma alternativa à utilização dos defensivos químicos. Bioinseticidas baseados na bactéria *Bacillus thuringiensis* Berliner, são os mais empregados, por produzirem toxinas com ação específica à fase larval de espécies de insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Homoptera, Orthoptera e algumas espécies da ordem Acari e dos filos Nematoda e Protozoa (FEITELSEN, 1992). *B. thuringiensis* é caracterizado principalmente pela produção de uma inclusão protéica, formada por proteína Cry ou  $\delta$ -endotoxina e Cyt, podendo produzir outras proteínas tóxicas, como Vip e Parasporina (CRICKMORE et al., 2008).

A classificação das proteínas Cry baseia-se na similaridade das seqüências de aminoácidos e estão agrupadas em 54 classes, assim como existem mais de 400 diferentes genes *cry* que codificam estas proteínas (CRICKMORE et al., 2008). Uma subespécie ou variedade de *B. thuringiensis* pode conter uma ou várias cópias de um mesmo gene *cry* ou cópias de diferentes genes cujos produtos formarão um mesmo cristal misto (LERECLUS et al., 1993) e o tipo do gene *cry* presente em um isolado correlaciona a especificidade da proteína Cry produzida. Algumas destas proteínas apresentam toxicidade a mais de uma ordem de insetos, como por exemplo, as Cry1I tóxicas às ordens Lepidoptera e Coleoptera (TAILOR et al., 1992).

A primeira proteína Cry1I foi caracterizada por TAILOR et al. (1992), tendo muitos outros tipos de genes *cry1I* caracterizados e publicados (CHOI et al., 2000, GLEAVE et al., 1993, SONG et al., 2003, TOUNSI et al., 2003) e atualmente são cerca de 15 *cry1I* agrupados em 6 subclasses (*cry1Ia* a *cry1If*) (CRICKMORE et al., 2008). Os genes *cry1I* codificam proteínas em torno de 70 a 80 kDa, que são secretadas na fase vegetativa do crescimento de *B. thuringiensis* e que não se acumulam como cristais (TAILOR et al., 1992, ESCUDERO et al., 2006, GROSSI-DE-SÁ et al., 2007). O fato de não estar envolvida na formação do cristal protéico faz com que esta toxina não seja incluída como ingrediente ativo nos inseticidas baseados em *B. thuringiensis*. Entretanto, a eficiência de Cry1I na proteção de plantas transformadas contra o ataque de insetos tem sido demonstrada (SELVAPANDIYAN et al., 1998, LAGNAOUI et al., 2001, LIU et al., 2004).

Com o advento da biotecnologia, genes que codificam proteínas com propriedades inseticidas podem ser isolados de *B. thuringiensis* e clonados em *Escherichia coli* ou em *B. thuringiensis* mutantes para genes *cry* (*cry*<sup>B</sup>), ou até mesmo modificados para expressarem adequadamente em plantas. Plantas de algodão Bt já têm sido adotadas por alguns fazendeiros de países como México, Estados Unidos e Argentina, diminuindo a aplicação de inseticidas entre 50% e 65% (SANTOS et al., 2003).

Os objetivos do presente estudo foram clonar em vetor de expressão o gene *cry1Ia* de um isolado brasileiro, expressar a proteína Cry1Ia em *E. coli* e avaliar sua atividade inseticida frente a larvas neonatas de *S. frugiperda* e *A. grandis*.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Linhagem de *Bacillus thuringiensis***

O gene *cry1Ia* completo foi amplificado a partir de um vetor presente em *E. coli* DH5 $\alpha$ . Este gene foi previamente clonado a partir da linhagem de *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* T01 328, isolada de solo de Cubatão-SP por SENA et al. (1994), inserido em vetor pGEM T-Easy e seqüenciado utilizando a estratégia “Gene Walking” (ESPINDOLA, 2003). A linhagem pertence a coleção do Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA) da FCAV-UNESP/Jaboticabal-SP.

### **Extração do DNA plasmidial**

O clone em *E. coli* DH5 $\alpha$  contendo o gene *cry1Ia* completo foi cultivado em 3 ml de meio líquido Luria-Bertani (LB) (10 g de triptona, 5 g de extrato de levedura, 10 g de NaCl, água destilada q. s. p. 1L, pH 7.2) enriquecido com 50  $\mu$ g/ml de canamicina, sob agitação constante a 200 rpm por cerca de 12 h. Em seguida, o DNA plasmidial contendo o gene *cry1I* completo foi extraído por miniprep conforme SAMBROOK & RUSSELL (2001).



### **Amplificação do gene *cry1Ia* completo**

A seqüência FASTA do gene *cry1Ia* completo do isolado T01 328 (GI AY262167) foi utilizada para a elaboração de um par de iniciadores que flanqueiam o gene, de modo a amplificá-lo completamente. Para que a subclonagem do referido gene no vetor de expressão pET28a(+) (Novagen) em *E. coli* fosse viabilizada, de forma que não se alterasse a fase de leitura na expressão, adicionou-se ao iniciador direto (5' CTAGCTAGCTACATGAAACTAAAGAATCAAGAT 3') uma seqüência de reconhecimento para a enzima de restrição *NheI* e ao reverso (5' ATAGTTTAGCGGCCGCATTCCTACATGTTACGCTC 3') uma para a enzima *NotI*.

As reações de PCR foram conduzidas utilizando-se 20 ng do DNA plasmidial e o conjunto de reagentes Expand High Fidelity Plus PCR System (Roche) seguindo as instruções do fabricante, que utiliza 1U da enzima Expand High Fidelity, 4 µl do tampão da enzima contendo 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de DNTPs e água destilada grau Milli-Q estéril q. s. p. 20 µl. As reações de PCR foram realizadas em aparelho termociclador, de acordo com o seguinte programa, com duas temperaturas de pareamento: 5 min a 95°C, 15 ciclos consistindo de 95°C por 1 min, 49°C por 1 min e 72°C por 2 min, e ao final dos ciclos uma extensão a 72°C por 10 min e após 5 min a 95°C de desnaturação, mais 20 ciclos consistindo de 95°C por 1 min, 54°C por 1 min e 72°C por 2 min, e ao final dos ciclos uma extensão extra a 72°C por 10 min. Ao fim de cada programa foi adicionado um passo único para manutenção da amostra a 10°C até a retirada dos tubos do termociclador.

Após as amplificações, 2 µl de tampão de amostra (0,5% de azul de bromofenol em glicerol 50%) foram adicionados a um volume de 15 µl de cada amostra e aplicados em gel de agarose 0,8% (p:v), contendo brometo de etídeo (0,5 µg/ml) e submetidos a eletroforese horizontal por 2 h a uma corrente elétrica de 75 V, conduzida em tampão TEB 1X (Tris 89 mM, EDTA 2,5 mM e Acido Bórico 89 mM com pH 8,3), também adicionado de brometo de etídeo (0,5 µg/ml). Em todas as eletroforeses realizadas, adotou-se o emprego de uma amostra de DNA com fragmentos de tamanhos conhecidos, múltiplos de 1 kb (1 kb DNA Ladder®), produzida pela Fermentas, a qual

serviu como referência de migração eletroforética para verificação da massa molecular dos fragmentos obtidos nas reações de amplificação. Os géis de agarose foram visualizados sob luz UV e documentados em equipamento Gel DOC 2000 (Bio-Rad).

### **Clonagem do gene *cry1/a* em *E. coli* BL21 (DE3)**

Para a expressão do gene de interesse, o produto amplificado foi ligado ao vetor de expressão pET28a(+), que contém uma seqüência de nucleotídeos que codifica uma 'cauda' de poli-histidina (6xHis), útil na detecção por Western Blotting e que pode ser utilizada na purificação da proteína por cromatografia de afinidade.

O gene completo amplificado foi purificado do gel utilizando-se o conjunto de reagentes "Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE)" conforme instruções do fabricante. O fragmento do gene *cry1/a* eluído foi então submetido à dupla clivagem com as enzimas *NheI* e *NotI* (New England Biolabs), consistindo em uma reação de 2 µl de tampão 10x que acompanha a enzima, 3 U de cada uma das enzimas, 2 µl de BSA 10 mg/µl, 5 µl (1,5 ug) do fragmento eluído e água destilada grau Milli-Q estéril q. s. p. 25 µl.

O vetor de expressão foi também clivado com as mesmas enzimas, em uma reação contendo 2,5 µl de tampão 10x que acompanha a enzima, 1 µl de cada uma das enzimas, 2,5 µl de BSA 10 mg/µl, 10 µl (10 ug) do vetor pET28(a)+ e água bidestilada estéril q.s.p. 25 µl. Em ambos os casos, as clivagens foram executadas por 12 h a 37°C. O vetor foi submetido à desfosforilação em uma reação contendo 5 U de enzima CIP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase) para cada 10 µg do vetor pET28(a)+ por 1 h a 37°C. Após incubação, inativou-se a enzima com EDTA (estoque 0,5M) para uma concentração final de 10mM a 70°C por 10 min e purificou-se em coluna para purificação de produto de PCR ("Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE)").

O gene *cry1/a* foi ligado no vetor de expressão, por meio da ação da enzima DNA ligase em um tubo de microcentrífuga de 500 µl contendo 3,5 µl de água destilada

grau Milli-Q estéril, 1 µl de tampão 10x que acompanha a enzima, 0,5 µl (200 U) de enzima T4 DNA ligase, 2 µl (150 µg) do fragmento eluído e 3 µl (1,2 µg) do vetor desfosforilado. A reação foi mantida a 16°C por 12 h. Em seguida, os vetores recombinantes foram transferidos para células competentes de *E. coli* BL21 (DE3), por meio de choque térmico, segundo HANAHAN et al. (1983).

Após este procedimento, 200 µl das células transformadas foram espalhadas nas placas de petri com o meio de cultura LB sólido (10 g de triptona, 5 g de extrato de levedura, 10 g de NaCl, 15 g de ágar, água destilada q. s. p. 1L, pH 7.2), suplementado com 50 µg/ml de canamicina, 100 µmM de Isopropil-beta-D-tiogalactopiranosideo (IPTG) e 40 mg/ml de 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside (X-GAL). As placas foram incubadas a 37°C por 12 h e, após este período, a presença de colônias brancas indicou o sucesso no procedimento.

As colônias recombinantes foram transferidas para tubos Falcon de 15 ml contendo 3 ml de meio de cultura LB líquido suplementado com 50 µg/ml de canamicina e incubados a 37°C por 12 h sob agitação constante a 110 rpm. Uma alíquota foi assepticamente estocada em glicerol estéril (40%), armazenada em ultra-congelador a -80°C e o restante foi utilizada para a extração do DNA plasmidial (SAMBROOK & RUSSELL, 2001). A análise dos clones transformantes foi feita por eletroforese em gel de agarose, após a clivagem do DNA plasmidial com as enzimas de restrição utilizadas na clonagem para verificação da inserção do gene no vetor de expressão.

### **Indução da expressão da proteína Cry1Ia**

Uma única colônia de um dos clones contendo o vetor de expressão com o gene foi inoculada em uma pré-cultura contendo 20 ml de meio LB com 50 µg/ml de canamicina e cultivados com agitação de 250 rpm a 37°C, durante 16 h. Esse pré-inóculo foi transferido para 200 ml de meio LB com 50 µg/ml de canamicina até que a OD<sub>600</sub> atingisse 0,025. Esta suspensão foi mantida sob agitação até a OD<sub>600</sub> 1,2, sendo que neste momento adicionou-se IPTG a uma concentração final de 1 mM, para a

indução da expressão. A cultura foi mantida a 37°C, durante a noite em agitação de 190 rpm. As células foram, então, coletadas por centrifugação a 7.400 x g por 30 min e lisadas por uma solução contendo 20 mM de tampão fosfato, 0,5 M de NaCl, pH 7,4, 100 mg/ml de lisozima, 1mg/ml de DNase, incubando-se por 30 min com agitação de 100 rpm a 37°C. Em seguida, foram submetidas à sonicação por 2 vezes de 60 s, com 10 s de pausa a 60W. Os sobrenadantes foram coletados a 7.400 x g a 4°C por min e utilizados para análise da proteína expressa e em bioensaios.

### **Análise da proteína por SDS-PAGE e Western Blotting**

A confirmação da produção da proteína de interesse foi aferida por meio de resolução de proteínas totais em gel SDS-PAGE 10% conforme LAEMMLI (1970). A eletroforese descontínua em gel de poliacrilamida foi realizada utilizando mini-gel (60 x 80 x 1,0 mm). O gel de empilhamento foi confeccionado à 5,0% contendo SDS 0,1% e o gel de separação à 10% contendo SDS 0,1% (m/v). A eletroforese foi realizada em tampão Tris-HCl 0,187M, Glicina 0,2M e SDS 0,075%(m/v), pH 8,4, à temperatura ambiente, submetida a 200 V constantes por 90 min. Para amostra de 20 µl de proteína, foram adicionados 10 µl de tampão de amostra [Tris-HCl 0,187M, pH 7,0 SDS 2,0% (m/v), Azul de Bromo Fenol 1,0% (m/v), glicerol 27% (v/v)] e β-mercaptoetanol 5,0%(v/v). A mistura foi aquecida por dois minutos a 100°C e aplicadas em dois géis igualmente. Após o período de corrida das amostras em gel, as bandas polipeptídicas foram, ao final, detectadas em um dos géis através da coloração com Coomassie-Brilliant Blue R-250 0,1% (m/v) dissolvido em solução fixadora [metanol 50% (v/v) e Ácido Acético 10% (v/v)] e descorado posteriormente em etanol 30% (v/v) e ácido acético 10% (v/v). Comparou-se o padrão de bandas de proteínas apresentado pela bactéria transformada pelo vetor plasmidial recombinante com o padrão apresentado pela bactéria contendo o vetor não recombinante, analisando a presença da banda da proteína Cry1Ia e sua massa molecular foi aferida comparando-se com o marcador PageRuler Prestained Protein Ladder (Fermentas). Foram utilizadas também quatro

concentrações diferentes de Soroalbumina bovina (BSA) (440, 220, 110 e 50 µg/ml), para a determinação da concentração da proteína expressa pelo programa Quantity One 1-D analysis (Bio-Rad) com reta determinada por BSA.

No Western Blotting, um dos géis de SDS-PAGE, feito conforme descrito anteriormente e não corado, contendo as referidas amostras e o marcador molecular Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (Fermentas) foi eletro-transferido em cuba de transferência úmida para uma membrana de HPVDF (Amersham Bioscience), utilizando-se um tampão de transferência (50 mM de Tris; 384 mM de glicina e 20% (v/v) de metanol pH 8,3) sendo o processo realizado a 15 V por 35 min e a 4°C. Após a transferência, a eficiência da mesma foi verificada corando-se a membrana com 0,1% Ponceau S dissolvido em ácido acético 1% e fazendo-se, a seguir, a descoloração, com água destilada. A membrana foi submetida ao bloqueio com 10 ml de PBS (salina tamponada com fosfato; 0,01 M tampão fosfato; 2,7 mM KCl<sub>2</sub>; 137 mM NaCl; pH 7,4) contendo 5% de leite em pó desnatado (LPD) e 0,02% Tween-20, sob agitação suave por 1h. Em seguida foi colocada em uma solução contendo o anticorpo primário “anticorpo monoclonal IgG de camundongo anti poli-histidina (Sigma)” e PBS na proporção de 1:500, sob agitação suave por 1h, a temperatura ambiente. Após lavagens com PBS, procedeu-se a reação com anticorpo secundário “conjugado imunoenzimático de peroxidase com o anticorpo de cabra anti-IgG de camundongo (Bethyl Laboratories Inc.)”, na diluição 1:500 em PBS-LPD 5%. Após a incubação por 1 h, a membrana foi novamente lavada com PBS e a reação de desenvolvimento da cor se processou com a mistura do cromógeno mais substrato específico (FAST DAB - Sigma) contendo dietil-amino-etil-benzidina (0,7 mg) e peróxido de hidrogênio - uréia (1,6 mg). Para interrupção da reação de degradação enzimática, a membrana foi lavada com água deionizada e, posteriormente, dessecada em temperatura ambiente e, ao final, guardada ao abrigo da luz (TOWBIN et al., 1979).

### Bioensaios de Concentração Letal Média (LC<sub>50</sub>)

Os bioensaios foram conduzidos no Centro de Ciências Agrárias – Universidade Federal do Espírito Santo, em Alegre-ES. O lisado do clone de *E. coli* BL21 (DE3) contendo proteína Cry1Ia expressa foi utilizado nos bioensaios para determinação da atividade bioinseticida da proteína. Tanto os bioensaios com *S. frugiperda* quanto os com *A. grandis* foram feitos de acordo com MARTINS et al. (2008).

Para os bioensaios com *S. frugiperda*, lagartas de primeiro instar foram alimentadas com dieta artificial, como descrito por PRAÇA et al. (2004), banhada com uma solução do lisado em dez diferentes concentrações ( $10^{-1}$  a  $10^{-10}$  ug/ml) a partir de uma solução estoque de 20 ug/ml de proteína Cry1Ia. O mesmo procedimento foi realizado para a testemunha, sendo substituído o lisado contendo a proteína Cry1Ia por um lisado de *E. coli* BL21 (DE3) contendo o vetor sem o inserto do gene. Os tratamentos foram acondicionados em câmara climatizada ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ), fotofase de 14 h e umidade relativa de  $70 \pm 5\%$ . Os tratamentos foram avaliados até sete dias após a inoculação (POLANCZYK et al., 2000) e a seguir foi feita a quantificação de lagartas mortas pela ação do *B. thuringiensis*, cuja LC<sub>50</sub> foi determinada com a análise de Probit (FINNEY, 1971).

Os bioensaios com larvas neonatas de *A. grandis* foram realizados incorporando-se 1 ml de uma solução do lisado em cinco diferentes concentrações (100, 50, 20, 10 e 5 ug/ml) em 35 ml de dieta artificial e, em seguida, a dieta foi vertida em placas de Petri (15mm x 20 mm). Após a solidificação, foram feitos 25 furos na dieta e em cada um foi colocada uma larva neonata de *A. grandis* (MARTINS et al., 2007). Da mesma forma foi feita para a testemunha, utilizando-se um lisado de *E. coli* BL21 (DE3) contendo o vetor sem o inserto do gene. Os tratamentos foram acondicionados em câmara climatizada ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ), fotofase de 14 h e umidade relativa de  $70 \pm 10\%$ . Os tratamentos foram avaliados após sete dias da inoculação (PRAÇA et al., 2004) e a seguir foi feita a quantificação de lagartas mortas pela ação do *B. thuringiensis* e a LC<sub>50</sub> foi obtida pela análise de Probit (FINNEY, 1971). Todos os bioensaios tiveram três repetições.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um novo gene da estirpe brasileira *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* T01 328, que codifica a proteína do grupo Cry1I, foi clonado e seqüenciado (número de acesso GenBank AY262167). A seqüência de nucleotídeos do gene completo que foi submetida ao site [http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil\\_Crickmore/Bt/index.html](http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/index.html) recebeu a nomenclatura *cry1Ia10*, após análise pela “Cry Gene Nomenclature Committee”. Com esta seqüência foram elaborados oligonucleotídeos específicos (Figura 1), usados na amplificação do gene *cry1Ia10* completo, para a inserção de sítios de restrição utilizados para a clonagem no vetor pET28(a)+. Inicialmente os oligonucleotídeos pareavam parcialmente com o gene e, após vários ciclos de amplificação com a primeira temperatura de pareamento (49°C), a parte não pareada, referente aos sítios de restrição, foi também amplificada. O aumento da temperatura fez com os oligonucleotídeos iniciadores pareassem completamente com a seqüência amplificada e, assim amplificou-se o gene com os sítios para as enzimas *Nhe* I e *Not* I, inseridos em suas extremidades, resultando em um amplicon de 2193 pb (Figura 3).

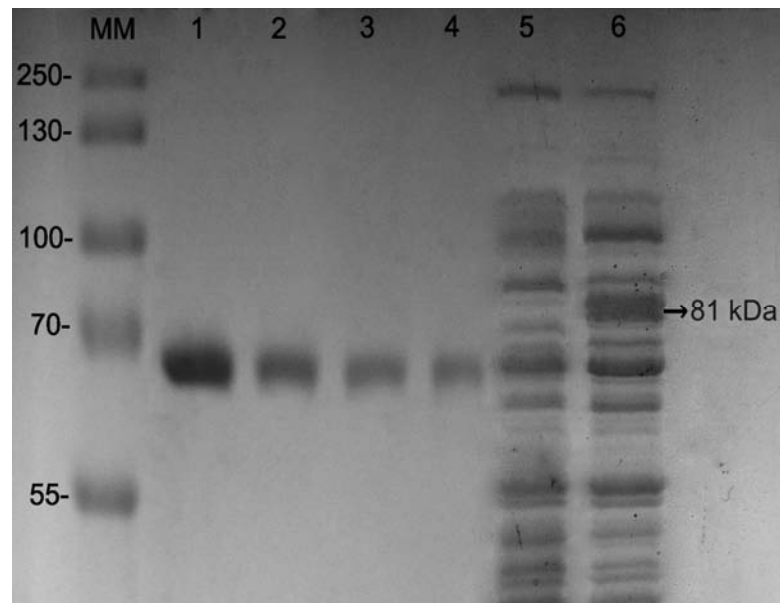
Os métodos de clonagem do gene *cry1Ia* no vetor pET28a(+) foi possível inserir o gene de interesse, resultando no vetor recombinante de 7478 pb (Figuras 2 e 3). A transformação de *E. coli* BL21 (DE3) com o vetor recombinante pET28a(+)-*cry1Ia* foi efetiva, confirmada pelos resultados das análises feitas por meio de dupla digestão com as enzimas *Nhe* I e *Not* I, resultando em dois fragmentos, um referente ao vetor, de 5318 pb, e outro de 2160 pb, correspondente ao gene *cry1Ia* completo (Figura 3).





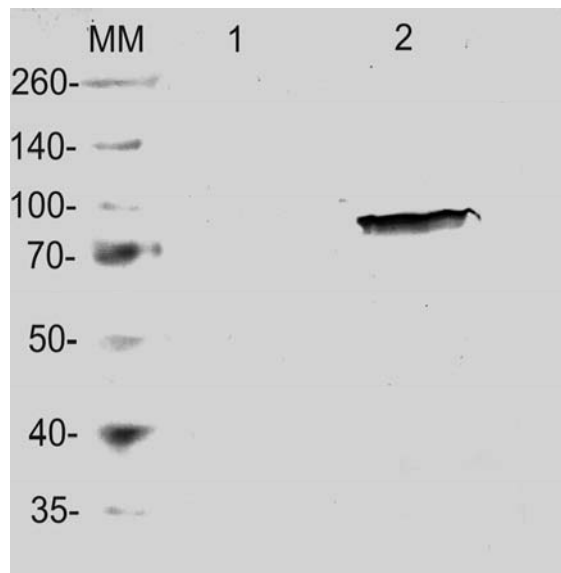


A análise pela técnica de SDS-PAGE demonstrou a presença de uma banda com peso molecular de aproximadamente 81 kDa, correspondente a proteína Cry1Ia, juntamente com várias outras frações protéicas da própria *E. coli*, comparados a um extrato da *E. coli* contendo o vetor sem inserto do gene (Figura 4), onde não se observou esta proteína. A proteína foi quantificada com curva padrão determinada por BSA e a concentração aferida foi de 250 µg/ml.



**Figura 4.** Detecção da proteína recombinante em gel de SDS PAGE 10%. Canaletas: MM= Marcador molecular em kDa, PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder; 1= 440 µg/ml de BSA; 2= 220 µg/ml de BSA; 3= 110 µg/ml de BSA; 4= 50 µg/ml de BSA; 5= Proteínas do extrato de células de *Escherichia coli* com vetor sem o inserto; 6= Proteínas do extrato de células do clone recombinante contendo a proteína Cry1Ia, indicada pela seta

A confirmação da expressão da proteína Cry1Ia em *E. coli* foi feita pelo método de Western Blotting, onde utilizou-se como anticorpo detector o anticorpo monoclonal IgG de camundongo anti poli-histidina, juntamente com o conjugado imunoenzimático de anticorpo de cabra anti-IgG de camundongo com a peroxidase, que identificou a proteína de peso molecular de aproximadamente 81 kDa no extrato de proteína bruta derivada da *E. coli* recombinante, através da presença da cauda de polihistidina, ao passo que não houve nenhuma detecção com relação ao extrato preparado com células de *E. coli* sem o inserto (Figura 5).



**Figura 5.** Detecção por Western Blotting da proteína Cry1Ia expressa em *Escherichia coli*. Canaletas: MM= Marcador molecular em kDa, Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (Fermentas); 1= Extrato de proteína total de células de *E. coli* com vetor sem o inserto; 2= Extrato de proteína total do clone recombinante de *E. coli*, evidenciando a proteína Cry1Ia com cauda de poli-histidina

Nos bioensaios com *S. frugiperda* e *A. grandis*, a LC<sub>50</sub> do lisado contendo a proteína Cry1Ia expressa foi determinada para cada espécie (Tabela 1), sendo que todos os resultados foram estatisticamente significativos. A LC<sub>50</sub> da proteína Cry1Ia foi de 0,002 µg/ml para *S. frugiperda* e de 5,23 µg/ml para *A. grandis*, significativamente menores que o controle negativo (0,03 e 29,97 µg/ml respectivamente).

**Tabela 1.** Bioensaios de dose/resposta de proteína Cry1Ia purificada de *Bacillus thuringiensis* e controle negativo a larvas de primeiro ínstar de *Spodoptera frugiperda* (A) e *Anthonomus grandis* (B)

**(A)**

Tratamento	n	$\alpha$	LC <sub>50</sub> µg/ml (IC <sub>0,05</sub> )	$\chi^2$	g.l.
Controle negativo	1440	1,13	0,03 (0,145; 0,01)	6,11	9
Proteína Cry1Ia	1440	1,27	0,002 (0,0005; 0,09)	5,34	9

**(B)**

Tratamento	n	$\alpha$	LC <sub>50</sub> µg/ml (IC <sub>0,05</sub> )	$\chi^2$	g.l.
Controle negativo	420	1,23	29,97 (45,35; 21,14)	7,56	4
Proteína Cry1Ia	420	1,09	5,23 (8,56; 2,19)	6,79	4

n = número de insetos/espécie; g.l. = graus de liberdade;  $\alpha$  = coeficiente angular;  $\chi^2$  = qui quadrado; IC<sub>0,05</sub> = intervalo de confiança

A expressão de genes de vários microrganismos em *E. coli* tem sido largamente utilizada com sucesso e trabalhando com esta técnica, obteve-se um novo gene *cry1Ia* de um isolado brasileiro clonado, expresso em *E. coli* e a toxicidade da proteína codificada foi testada frente a pragas das ordens Lepidoptera e Coleoptera,

confirmando a ação efetiva da proteína Cry1Ia. Esta estratégia possibilitou verificar que a nova proteína tem propriedades inseticidas interessantes, particularmente pelo amplo espectro de ação, propriedade de algumas das proteínas desse grupo. Toxinas Cry1I são de particular interesse, uma vez que apresentam uma gama de ação a insetos da ordem Lepidoptera e Coleoptera, propriedade também encontrada em outras proteínas como as Cry1B, Cry1C e Cry2A, que também exibem ação a mais de uma ordem (ABDUL & ELLAR, 1999; BRADLEY et al., 1995; WIDNER & WHITELEY, 1990, ZHONG et al., 2000).

O alinhamento da seqüência consenso de nucleotídeos do isolado T01 328 (número de acesso GenBank AY262167) com a seqüência do gene *cryV* de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD1(gi 1621215) resultou em 99% de identidade revelando quatro substituições de bases: G por A (posição 476 pb), T por C (posição 1719 pb), C por G e G por C (posição 2133 pb). Estas substituições levaram, respectivamente, à troca dos aminoácidos: arginina por lisina (AGG por AAG- resíduo 159), fenilalanina por ela mesma (TTT por TTC- resíduo 573), asparagina por lisina (AAC por AAG - resíduo 711) e Ácido Glutâmico por Glutamina (GAA por CAA- resíduo 712) resultando em 99% de identidade com a seqüência de aminoácidos de acesso Y08920.

O alinhamento dos nucleotídeos com a seqüência reportada por GLEAVE et al. (1993) revelou somente uma transição de C para T na posição 1398 pb relativa ao códon inicial ATG, não resultando em alteração da seqüência de aminoácidos. Estes resultados corroboram com aqueles descritos por KOSTICHKA et al. (1996), ao seqüenciar o gene *cryV* da linhagem de *B. thuringiensis* AB88. O alinhamento da seqüência de nucleotídeos do gene *cry1Ia10* do isolado T01 328 evidenciou identidade de 99% com as seqüências dos genes *cry1Ia1*, *cry1Ia2*, *cry1Ia3* *cry1Ia4*, *cry1Ia5*, *cry1Ia6* e *cry1Ia8*; 97% com *cry1Ia7* e com *cry1Ib1*, *cry1Ic1*, *cry1Id1* e *cry1Ie1* a identidade foi de 93%, 92%, 90% e 94% respectivamente. A seqüência de nucleotídeos do isolado T01328 também apresentou similaridade, variando de 57 a 65%, com seqüências de nucleotídeos dos genes *cry1B*, cuja proteína inseticida atua tanto em larvas de coleópteros como de lepidópteros (BRADLEY, 1995).

De acordo com os resultados descritos na literatura por KOSTICHKA et al. (1996), a análise da seqüência deduzida de proteína do gene *cry1I* do isolado T01328 também revelou a presença de um domínio N-terminal o qual atua como um peptídeo sinal. Embora as seqüências tenham alto grau de similaridade com outras proteínas Cry, os primeiros 34 aminoácidos mostram desprezível homologia. O domínio N-terminal do gene *cry1Ia* contém características como trechos de aminoácidos carregados positivamente (do M-1 a Q-10) seguidos por resíduos hidrofóbicos (do S-11 a A16) e uma região polar (a partir do K-17), as quais podem funcionar como um peptídeo sinal em espécies de *Bacillus* (SIMONEN & PALVA, 1993). Dessa maneira, pode-se concluir que estes dados indicam que a proteína Cry1Ia é secretada, produzida no início da fase estacionária (KOSTICHKA et al., 1996).

Utilizou-se o sistema de expressão em *E. coli* para a produção da proteína Cry1Ia, que nesta análise, o peso molecular da proteína Cry1Ia10 foi aferido através da técnica de SDS-PAGE, tendo peso aproximadamente o da proteína nativa de 81 kDa. Um incremento do peso deve-se a adição da cauda de poli-histidina. A técnica de Western Blotting confirmou a correta expressão do gene *cry1Ia10*, pelo reconhecimento da cauda de poli-histidina na fração da proteína com o tamanho previsto. Genes de *B. thuringiensis* têm sido isolados e clonados em *E. coli* ou em *B. thuringiensis* mutantes para genes *cry* (*cryB*) (BHALLA et al., 2005; KUMAR et al., 2005; HERNANDEZ-MARTINEZ et al., 2008).

Nos estudos de SILVA-WERNECK & MONNERAT (2001) e LI-MING et al. (2007), as proteínas *cry* expressas foram utilizadas em bioensaios e sua DL<sub>50</sub> foi determinada, verificando isoladamente a sua toxicidade à praga utilizada. Neste trabalho, a LC<sub>50</sub> para a proteína recombinante Cry1Ia10 foi de 0,002 µg/ml para *S. frugiperda* e de 5,23 µg/ml para *A. grandis*, mostrando uma elevada toxicidade a estas pragas. Quando comparados com resultados de outros trabalhos utilizando proteínas Cry1I contra as mesmas pragas, a proteína Cry1Ia10 tem a maior eficiência, com as LC<sub>50</sub> menores. A proteína recombinante Cry1Ia12 expressa em *E. coli*, mostrou toxicidade moderada frente a larvas de primeiro instar de *A. grandis* e *S. frugiperda*, sendo a LC<sub>50</sub> de 230 µg/ml e 5 µg/ml respectivamente (GROSSI-DE-SÁ et al., 2007). No trabalho de

MARTINS et al. (2008), uma proteína Cry1Ia foi clonada no genoma de baculovírus, expressa em células infectadas de insetos e a alta toxicidade foi demonstrada nos bioensaios com a proteína purificada contra larvas neonatas de *A. grandis* e *S. frugiperda*, sendo cerca de 15 vezes maior que o padrão (*B. thuringiensis* var. *tenebrionis*) nos ensaios com *A. grandis* (21,5 µg/ml) e cerca de 160 vezes maior que o padrão utilizado (*B. thuringiensis* var. *kurstaki* S1450) para *S. frugiperda* (0,289 µg/ml), assim como não demonstrou resultados significativos quando testada contra *Plutella xylostella* e *Anticarsia gemmatalis*.

Isolados portadores de novos genes *cry1I* têm sido estudados. No trabalho de ESCUDERO et al. (2006), um novo gene *cry1I*, denominado de *cry1Ia7* foi isolado e sua proteína expressa em *E. coli*. Esta proteína foi solúvel em água e apresentou-se tóxica a várias espécies de insetos. Ensaio de união foram realizados com a toxina Cry1Ia7 biotinizada e demonstraram que esta não ocupa o mesmo sítio de união das toxinas Cry1Ab ou Cry1Ac no intestino de *Earias insulana* e *Lobesia botrana*, as quais são comumente encontradas em culturas Bt e em bioinseticidas comerciais baseados em *B. thuringiensis*. Portanto, os autores discutem a possibilidade desta nova toxina ser usada em combinação com as proteínas Cry1Ab e Cry1Ac no controle das pragas e manejo da resistência.

A expressão em *E. coli* da proteína Cry1Ia produz corpos de inclusão quando são expressos nesta bactéria, o que não ocorre em *B. thuringiensis*, devido ao fato de que as proteínas Cry1I são secretadas no meio de cultura e não participam da formação de cristais (CHOI et al., 2000), impedindo o seu uso em aplicações de bioinseticidas (ESCUDERO et al. 2006). Contudo, suas características inseticidas podem ser exploradas com sucesso se as proteínas Cry1I forem expressas em plantas transgênicas (LAGNAOUI et al., 2001, LIU et al., 2004).

## CONCLUSÕES

- O sistema bacteriano da *Escherichia coli* BL21 (DE3) com o vetor pET28a(+) foi eficiente na expressão da proteína Cry1Ia10;
- A proteína Cry1Ia10 recombinante demonstrou alta toxicidade às larvas neonatas de *S. frugiperda* e *A. grandis*, tendo um grande potencial para a obtenção de plantas transgênicas de algodão resistentes a estas pragas.



## REFERÊNCIAS

- ABDUL-RAUF, M.; ELLAR D.J. Toxicity and receptor binding properties of a *Bacillus thuringiensis* CryIC toxin active against both Lepidoptera and Diptera. **Journal Invertebr. Pathol.**, New York, v.73, p. 52–58, 1999.
- BARRETO, M.R.; LOGUERCIO, L.L.; VALICENTE, F.H.; PAIVA, E. Atividade inseticida do sobrenadante da cultura de cepa de *Bacillus thuringiensis* Berliner contra lagartas de *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera:Noctuidae). **An. Sociedade Entomol. do Brasil**, Londrina, v. 28, n. 4, p. 675-685, 1999.
- BEN-DOV, E., ZARISTSKY, A., DAHAN, E., BARAK, Z., SINAI, R., MANASHEROB, R., KHAMRAEV, A., TROITSKAYA, E., DUBITSKY, A., BEREZINA, N., MARGALITH, Y. Extended screening by PCR for seven cry-group genes from field-collected strains of *Bacillus thuringiensis*. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 63, p. 4883-4890, 1997.
- BHALLA, R.; DALAL, M.; PANGULURI, S.K.; JAGADISH, B.; MANDACKAR, A.D.; SINGH, A.K.; KUMARR, P.A. Isolation, characterization and expression of a novel vegetative insecticidal protein gene of *Bacillus thuringiensis*. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v.243, p. 467–472, 2005.
- BOBROWSKI, V. L.; FIUZA, L. M.; PASQUALI, G.; BODANESE-ZANETTINI, M. H. Genes de *Bacillus thuringiensis*: uma estratégia para conferir resistência a insetos em plantas. **Ciência Rural**. Santa Maria, v. 34. p.843-850, 2003.
- BRADLEY, D.; HARKEY, M.A.; KIM, M.K.; BREVER, D.; BAUER, L.S. The insecticidal CryIB protein of *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis* has dual specificity to coleopteran and lepidopteran larvae. **Journal Invertebr. Pathol.**, New York, v.65, p.162-173, 1995.

BRAVO, A. et al. Characterization of cry genes in a mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied Environm. Microbiol.**, Washington, v. 64, n. 12, p. 4965-4972, 1998.

BRAVO, A.; GÓMEZ, I.; CONDE, J.; MUÑOZ-GARAY, C.; SÁNCHEZ, J.; MIRANDA, R.; ZHUANG, M.; GILL, S.S.; SOBERÓN, M. Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1667, p. 38–46, 2004.

BUSOLI, A.C.; SOARES, J.J.; LARA, F.M. O bicudo do algodoeiro e seu manejo (Boletim 5). FUNEP, Jaboticabal, 32 p., 1994.

CAROZZI, N. B. et al. Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. **Applied Environm. Microbiol.**, Washington, v. 57, n. 11, p. 3057-3061, 1991.

CERON, J.; COVARRUBIAS, L.; QUINTERO, R.; ORTIZ, A.; ORTIZ, M.; ARANDA, E.; LINA, L.; BRAVO, A. PCR analysis of the *cryI* insecticidal crystal family genes from *Bacillus thuringiensis*. **Applied Environm. Microbiol.**, Washington, v. 60, p. 353-356, 1994.

CHOI, S. K.; SHIN, B. S.; KONG, E. M.; RHO, H. M.; PARK, S. H. Cloning of a new *Bacillus thuringiensis* Cry1I-type crystal protein. **Curr. Microbiol.** New York, v. 41, p. 65-69, 2000.

COPPING, L. G.; MENN, J .J. Review biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. **Pest Managem. Science**, West Sussex, v. 56, n.5, p. 651-676, 2000.

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D.R.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; BRAVO, A.; DEAN, D.H. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature [Online] [http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil\\_Crickmore/Bt/index.html](http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/index.html). Acesso em dezembro de 2008.

ESCUADERO, I. R.; ESTELA, A.; PORCAR, M.; MARTÍNEZ, C.; OGUIZA, J. A.;

ESCRICHE, B.; FERRÉ, J.; CABALLERO, P. Molecular and Insecticidal Characterization of a CryII Protein Toxic to Insects of the Families Noctuidae, Tortricidae, Plutellidae, and Chrysomelidae. **Applied and Environm. Microbiol.**, Washington, v. 72, n. 7, p. 4796–4804, 2006.

ESPINDOLA, R. Seqüência completa do gene *cry1Ia* do isolado T01 328 de *Bacillus thuringiensis* provenientes do solo de Cubatão (SP-Brasil). 2003. 55 p. Tese de Mestrado em Agronomia, área de concentração Genética e Melhoramento de Plantas – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal.

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. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 93, p. 5389-5394, 1996.

FEITELSON, J. S. et al. *Bacillus thuringiensis* insects and beyond. **Bio/Technology**, New York, v. 10, p. 271-176, 1992.

FERRÉ, J.; GONZÁLEZ-CABRERA, J.; ESCRICHE, B.; HERRERO, S. Estrategias de manejo de la resistencia para preservar la utilidad de las plantas Bt. **Boletín electrónico de la Sociedad Española de Genética**, n. 20 p. 13-17, 2005.

FINNEY, D.J. **Probit Analysis**. Cambridge: Cambridge University Press, 1971.

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

GLARE, T. R., O'CALLAGHAN, M. ***Bacillus thuringiensis: biology, ecology and safety***. Chichester: John Wiley & Sons, 2000. p. 350.

GLEAVE, A. P., WILLIAMS, R., HEDGES, R. J. Screening by polymerase chain reaction of *Bacillus thuringiensis* serotypes for the presence of CryV-like insecticidal protein

genes and characterization of a cryV gene cloned from *Bacillus thuringiensis* subsp *kurstaki*. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 59, p. 1683-1687, 1993.

GONZÁLEZ Jr., J. M.; BROWN, B. S.; CARLTON, B. C. Transfer of *Bacillus thuringiensis* plasmids coding for  $\delta$ -endotoxin among strains of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus*. **Proceed. Nation. Acad. Sciences USA**, Washington, v. 79, n.22. p. 6951-6955, 1982.

GONZÁLEZ Jr., J. M.; CARTON, B. C. Patterns of plasmid DNA in crystalliferous and acrySTALLIFEROUS strains of *Bacillus thuringiensis*. **Plasmid**, New York, v. 3, n.1, p. 92-98, 1981.

GORDON, R.E.; HAYVES, E.C.; PANG, C.H.N. **The Genus Bacillus**. Washington DC: Agriculture Research Service; Agriculture Handbook, n.427, p.283, 1973.

GROSSI-DE-SA, M. F. et al. Susceptibility of *Anthonomus grandis* (Cotton Boll Weevil) and *Spodoptera frugiperda* (Fall Armyworm) to a Cry1Ia-type Toxin from a Brazilian *Bacillus thuringiensis* Strain. **Journal Biochem. Molecul. Biol.**, Seoul, v. 40, n. 5, p. 773-782, 2007.

HANAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Journal Mol. Biol.**, London, v.166, p.557-580,1983.

HERNANDEZ-MARTINEZ, P. et al. Susceptibility of *Spodoptera exigua* to 9 toxins from *Bacillus thuringiensis*. **J. Invertebr. Pathol.**, New York, v. 97, p 245-250, 2008.

HOFMANN, C.; VANDERBRUGGEN, H.; HÖFTE, H.; VAN RIE, J.; JANSENS, 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**, Washington, v.85, p.7844-7848, 1988.

HOFTE, H.; WHITELEY, H. R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 53, n. 3, p. 242-255, 1989.

JURAT-FUENTES, J.L.; ADANG, M.J. Cry toxin mode of action in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. **Jounal Invert. Pathol.**, New York, v. 92, p. 166–171, 2006.

KNOWLES, B. H. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal  $\delta$ -endotoxins. **Advanc. Insect Physiol.**, v. 24, n. 2, p. 275-308, 1994.

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.

KOSTICHKA. K.; WARREN, G.W.; MULLINS, M.; MULLINS, A.D.; CRAIG, J.A.; KOZIEL, M.G.; ESTRUCH, J.J. Cloning of a *cryV*-type insecticidal protein gene from *Bacillus thuringiensis*: the *cryV*-encoded protein is expressed early in stationary phase. **Journal Bacteriol.**, Washington, v. 178, p. 2141–2144, 1996.

KUMAR, S.; BIRAH, A.; CHAUDHARY, B.; BURMA, P.K.; GUPTA, G.P.; PENTAL, D. Plant codon optimized *cry* genes of *Bacillus thuringiensis* can be expressed as soluble proteins in *Escherichia coli* BL21 Codon Plus strain as NusACry protein fusions. **Journal Inverteb. Pathol.**, New York, v. 88, n. 1, p. 83-86, 2005.

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

LAGNAOUI, A., CAÑEDO, V., DOUCHES, D.S. Evaluation of *Bt-cry1Ia1(cryV)* transgenic potatoes on two species of potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* and *Symmetrischema tangolias* (Lepidoptera: Gelechiidae) in Peru. **CIP Program Rep. 1999–2000**, p. 117–121, 2001.

LECADET, M. M. et al. Updating the H-antigen classification of *Bacillus thuringiensis*. **Journal Applied Microbiol.**, Oxford, v. 86, n. 4, p. 660-672, 1999.

LEONARDI, M.G.; CACCIA, S.; GÓNZALEZ-CABRERA, J.; FERRÉ, J.; GIORDANA, B. Leucine transport is affected by *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxins in BBMV from *Ostrinia*

*nubilalis* Hb (Lepidoptera: Pyralidae) and *Sesamia nonagroides* Lefebvre (Lepidoptera: Noctuidae) midgut. **Journal Memb. Biol.**, v. 214, p. 157–164, 2007.

LERECLUS, D.; DELECLUSE, A.; LECADET, M. M. Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. In: ENTWISTLE et al. ***Bacillus thuringiensis* an environmental biopesticide**: theory and practice. Chichester: John Wiley, 1993. p. 37-70.

LERECLUS, D.; AGAISSE, H.; GRANDVALET, C.; SALAMITOU, S.; GOMINET, M. Regulation of toxin and virulence gene transcription in *Bacillus thuringiensis*. **Int. Journal Med. Microbiol.**, 290:295–299, 2000.

LI, J. et al. Crystal structure of insecticidal  $\delta$ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. **Nature**, Londres, v. 353, p. 815-821, 1991.

LI-MING, D.; LAN-LAN, H.; JIE, Z.; KANG-LAI, H.; KUI-JUN, Z.; DA-FANG, H.; FU-PING, S. Cloning, expression and activity of *cry1la* gene from *Bacillus thuringiensis* isolate. **Journal Agricult. Biotechnol.**, v. 15, n. 6, p. 1053–1057, 2007.

LIU, K. Y., ZHENG, B. L., HONG, H. Z., JIANG, C. F., PENG, R., PENG, J. X., YU, Z. H., ZHENG, J., YANG, H. Characterization of cultured insect cells selected by *Bacillus thuringiensis* crystal toxin. **In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.**, v. 40, p. 312-317, 2004.

MARMUR, J.A. Procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. **Journal Molec. Biol.**, London, v. 3, n. 1, p. 208-218, 1961.

MARTINEZ, C.; CABALLERO, P. Contents of *cry* genes and insecticidal toxicity of *Bacillus thuringiensis* strains from terrestrial and aquatic habitats. **Journal Applied Microbiol.**, Oxford, v. 92, n. 4, p. 745-752, 2002.

MARTINS, E.S.; AGUIAR, R.W.D.S.; MARTINS, N.F.; MELATTI, V.M.; FALCÃO, R.; GOMES, A.C.M.; RIBEIRO, B.M.; MONNERAT, R.G. Recombinant Cry1la protein is highly toxic to cotton boll weevil (*Anthonomus grandis* Boheman) and fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*). **Journal Applied Microbiol.**, Oxford, v. 104, p. 1363-1371, 2008.

- MARTINS, E.S.; PRAÇA, L.B.; DUMAS, V.F.; SILVA-WERNECK, J.O.; SONE, E.H.; WAGA, I.C.; BERRY, C.; MONNERAT, R.G. Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates toxic to cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*). **Biol. Control.**, Amsterdam, v. 40, p. 65–68, 2007.
- MONNERAT, R.G.; BATISTA, A.C.; MEDEIROS, P.T.; MARTINS, E.S.; MELATTI, V.M.; PRAÇA, L.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 gemmatilis*. **Biol. Control**, Amsterdam, v. 41, n. 3, p. 291-295, 2007.
- MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M. F. Produção de bactérias entomopatogênicas. In: ALVES, S. B. **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba: Manole, 1981.
- POLANCZYK, R.A.; SILVA, R.F.P.; FIUZA, L.M. Effectiveness of *Bacillus thuringiensis* strains against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Braz. Journal Microbiol.**, v. 31, p. 165-167, 2000.
- PRAÇA, L.B.; BATISTA, A.C.; MARTINS, E.S.; SIQUEIRA, C.B.; DIAS, D.G.D.; GOMES, A.C.M.M.; FALCAO, R.; MONNERAT, R.G. *Bacillus thuringiensis* strains effective against insects of Lepidoptera, Coleoptera and Diptera orders. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v. 39, n. 1, 2004.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning** : a laboratory manual. 3 rd. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 309 p., 2001.
- SANTOS, R.C.; MARCELLINO, L.H.; MONNERAT, R.G.; GANDER, E.G. Mechanical damage in cotton buds caused by the boll weevil. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v. 38, p. 1351–1355, 2003.
- SAUKA, D.H.; SÁNCHEZ, J.; BRAVO, A.; BENINTENDE, G.B. Toxicity of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins against bean shoot borer (*Epinotia aporema* Wals.) larvae, a major soybean pest in Argentina. **Jounal Inverteb. Pathol.**, New York, v. 94, p. 125-129, 2006.

- SEIFINEJAD, A.; SALEHI JOUZANI, G.R.; HOSSEINZADEH, A.; ABDMISHANI, C. Characterization of Lepidoptera-active *cry* and *vip* genes in Iranian *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Biol. Control**, Amsterdam, v. 44, p. 216-226, 2008.
- SELVAPANDIYAN, A., REDDY, V. S., KUMAR, P., TEWARI, K. K., BHATNAGAR, R. K. Transformation of *Nicotiana tabacum* with a native *cry1Ia5* gene confers complete protection against *Heliothis armigera*. **Molecul. Breeding**, v. 4, 473-478, 1998.
- SENA, J. A. D. et al. Caracterização de um provável isolado de *Bacillus thuringiensis* proveniente do solo de Cubatão (SP). In: **4º SICONBIOL - Simpósio de Controle Biológico**, Gramado, Anais: Sessão de Pôsteres, p.129, 1994.
- SILVA-WERNECK, J. O.; MONNERAT, R. **Metodologias para caracterização de isolados de *Bacillus thuringiensis***. Brasília, 5 p., 2001.
- SIMONEN, M.; PALVA, I. Protein secretion in *Bacillus* species. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 57, p.109–137, 1993.
- SONG, F. P., ZHANG, J., GU, A. X., WU, Y., HAN, L. L., HE, K. L., CHEN, Z. Y., YAO, J., HU, Y. Q., LI, G. X., HUANG, D. F. Identification of *cry1I*-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains and characterization of a novel *cry1I*-type gene. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 69, p. 5207-5211, 2003.
- SUN, Y.; FU, Z.; DING, X.; XIA, L. Evaluating the Insecticidal Genes and Their Expressed Products in *Bacillus thuringiensis* Strains by Combining PCR with Mass Spectrometry. **Appl Environ. Microbiol.**, Washington, v. 74, p. 6811–6813, 2008.
- TAILOR, R. J., TIPPET, et al. Identification and Characterization of a Novel *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Entomocidal to Coleopteran and Lepidopteran Larvae. **Molecul. Microbiol.**, Oxford, v. 6, n. 9, May, p. 1211-1217. 1992.
- THAMMASITTIRONG, A.; ATTATHOM, T. PCR-based method for the detection of *cry* genes in local isolates of *Bacillus thuringiensis* from Thailand. **Journal Invert. Pathol.**, New York, v. 98, n. 2, p. 121-126, 2008.



- TOUNSI, S.; ZOUARI, N.; JAOUA, S. Cloning and study of the expression of a novel *cry1Ia*-type gene from *Bacillus thuringiensis* subsp *kurstaki*. **Journal Appl. Microbiol.**, Oxford ,v. 95, p.23–28, 2003.
- TOWBIN, H.T., STAEHETIN.A., GORDON, J. Eletroforetic transfer of protein from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: Produce abd some applications. **Proc. Nati. Acad. Sci.**, U.S.A., Washington, v. 76, p. 4350-4354, 1979.
- VALADARES-INGLIS, M. C. C.; SHILER, W.; SOUZA, M. T. de. Engenharia genética de microrganismos agentes de controle biológico. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. v. 1, p. 201-230.
- Van FRANKENHUYZEN K. The challenge of *Bacillus thuringiensis*. **Bacillus thuringiensis, an Environmental Biopesticide: Theory and Practice** (ed. by P F Entwistle, S Cory, M J Bailey & S Higgs), pp. 1–23. Wiley, Chichester, UK, 1993.
- VILAS-BÔAS, G. T.; LEMOS, M. V. Diversity of cry genes and genetic characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from Brazil. . **Can. J. Microbiol./Rev. can. microbiol.** Canadá, v. 50, n. 8, p. 605-613, 2004.
- WANG, J. H. et al. Characterization of *cry1*, *cry2*, and *cry9* genes in *Bacillus thuringiensis* isolates from China. **Journal Inverteb. Pathol.**, New York, v. 82, n. 1, p. 63-71, 2003.
- WIDNER, W.R.; WHITELEY, H.R. Location of the dipteran specificity region in a lepidopteran-dipteran crystal protein from *Bacillus thuringiensis*. **Jounal Bacteriol.**, Washington, v. 172, p. 2826–2832, 1990.
- XUE, J. L. et al. The synergistic activity between Cry1Aa and Cry1C from *Bacillus thuringiensis* against *Spodoptera exigua* and *Helicoverpa armigera*. **Lett. Applied Microbiol.**, Oxford, vol. 40, n. 6, p. 460-465, 2005.
- YAMAMOTO, T.; DEAN, D. H. Insecticidal proteins produced by bacteria pathogenic to agriculturas pests. In: CHARLES, J.F. et al. (Ed.). **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application**. Ottawa:Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 81-100.

ZHANG, X.; CANDAS, M.; GRIKO, N.B.; ROSE-YOUNG, L.; BULLA JR., L.A. Cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin depends on specific binding of the toxin to the cadherin receptor BT-R1 expressed in insect cells. **Cell Death Differ.**, Rome, v. 12, p. 1407–1416, 2005.

ZHONG, C. H., ELLAR D. J., et al. Characterization of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin which is toxic to insects in three orders. **Journal of Inverteb. Pathol.**, New York, v. 76, n. 2, Aug, p.131-139, 2000.

ZONTA, E.P., MACHADO, A.A. **SANEST** – Sistema de análise estatística para microcomputadores. Pelotas, DMEC/IFM/UFPel, 138p, 1987.