

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL

IDENTIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E TESTE DE  
TOXICIDADE CONTRA NEMATOIDES DE NOVOS GENES *cry*  
DE *Bacillus thuringiensis*

Janaína Fernandes Gonçalves  
Engenheira Florestal

JABOTICABAL – SP – BRASIL  
Fevereiro de 2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**IDENTIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E TESTE DE  
TOXICIDADE CONTRA NEMATOIDES DE NOVOS GENES *cry*  
DE *Bacillus thuringiensis***

**Janaína Fernandes Gonçalves**

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

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Microbiologia – Área de Concentração em Microbiologia Agropecuária.

JABOTICABAL – SP – BRASIL

Fevereiro de 2010

G635i Gonçalves, Janaína Fernandes  
Identificação, caracterização e teste de toxicidade contra nematoides de novos genes *cry* de *Bacillus thuringiensis*. / Janaína Fernandes Gonçalves. – Jaboticabal, 2010  
xiv, 93 f. ; il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2010

Orientador: Manoel Victor Franco Lemos

Banca examinadora: Edgard Augusto de Toledo Picoli, Fernando Hercos Valicente, Flávia Maria de Souza Carvalho, Jaime Maia dos Santos

Bibliografia

1. *Bacillus thuringiensis*. 2. genes *cry*. 3. controle biológico. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 575: 632.937

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

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**TÍTULO: IDENTIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E TESTE DE TOXICIDADE CONTRA NEMATOIDES DE NOVOS GENES *cry* DE *Bacillus thuringiensis***

**Autor: Janaína Fernandes Gonçalves**

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

Aprovada como parte das exigências para a obtenção do Título de DOUTOR em MICROBIOLOGIA – ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos

Prof. Dr. Edgard Augusto de Toledo Picoli

Dra Flávia Maria de Souza Carvalho

Dr. Fernando Hercos Valicente

Prof. Dr. Jaime Maia dos Santos

Data da realização: 23 de fevereiro de 2010.

Presidente da Comissão Examinadora

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

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**JANAÍNA FERNANDES GONÇALVES**, natural de Ubá – MG, nascida aos 23 dias de Janeiro de 1974, formada no ensino médio no ano de 1992 e no Magistério no ano de 1993, na Escola Estadual Senador Levindo Coelho localizada no município de Ubá – MG. Graduada em Engenharia Florestal pela Universidade Federal de Viçosa – UFV, tendo como data sua primeira matrícula em fevereiro de 1994 e colação de grau em janeiro de 2000. Neste período realizou diversos estágios, tanto na própria instituição como em empresas privadas. Foi bolsista de iniciação científica pelo CNPq onde desenvolveu pesquisa relacionada com controle biológico de insetos durante 2 anos. Nos anos de 2000 a 2002 lecionou para primeiro e segundo grau em escolas públicas e privadas nos municípios de Viçosa e Ubá. No ano de 2003 estagiou no laboratório de Genética de Bactérias, e, em 2004 iniciou o seu mestrado, defendendo sua dissertação sob orientação do Prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos em 23 de fevereiro de 2006. Defendeu sua tese de doutorado em 23 de fevereiro de 2010.

“É preciso sonhar com a condição de acreditar seriamente nos seus sonhos, observar a vida atentamente, comparar suas observações com os seus sonhos, e trabalhar escrupulosamente para a realização de suas fantasias”

Vladimir Ilitch Ulianov **LENIN**  
estadista russo (1870 - 1924)

Dedico este livro aos amigos

Aos que se tornaram familiares,  
Aos que nasceram familiares  
e aos que conheci antes de ontem.

Dedico tanto aos que me deixam louco,  
Quanto aos que enlouqueço.

Aos que me criticam em tudo,  
E a um ou outro que atura  
Minha "chatura"

Aos amigos que correm,  
Aos amigos que contemplam.

Aos que me consideram muito,  
E aos muitos que, com razão, fazem pouco.

Aos que conhecem o que penso,  
E aos que só conhecem o que faço.

Aos que passam o dia todo comigo  
e aos que estão todo o tempo em mim.

Este livro é a soma de todos vocês.  
E se ele não é melhor,  
É por falta de memória,  
Mas não por falta de amigos.

(Efraim Rodrigues & Richard B. Primack, *Biologia da Conservação*, 2001)

A você **Marcelo Luiz de Laia**, meu querido companheiro, e aos meus filhos **Marcella Gonçalves de Laia** e **Inael Wilson Gonçalves de Laia**, meus eternos amores, dedico esta obra, que tem muito de vocês por tudo que fizeram ou simplesmente suportaram. Obrigada por fazerem parte da minha caminhada.

**Dedico**

A Deus pela força, aos meus pais, **Maria José Fernandes Gonçalves** e **Wilson Gonçalves**, pelo exemplo de vida por terem compartilhado dos meus ideais e tanto tem contribuído para que eles se realizem. A minha irmã **Elisângela**, pelo amor, incentivo e apoio.

**ofereço**

Agradeço à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias- FCAV/UNESP pela estrutura e a **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pela concessão da bolsa de estudo e dos auxílios que permitiram a realização deste trabalho (processo nº 06/50507 -0).

## Agradecimentos

Agradeço ao Prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos, orientador dessa tese, por ter me oferecido a oportunidade de fazer parte de sua equipe. Confiando no meu trabalho, permitiu que eu desse esse grande passo e pudesse crescer sob tantos outros aspectos. Seu apoio ao meu ingresso no Mestrado e no Doutorado, suas observações e sugestões foram fundamentais para o meu aprendizado.

Ao meu amor, Marcelo Luiz de Laia, que além de meu querido marido é companheiro, carinhoso e professor! Obrigada por todos os ensinamentos, pelos momentos de alegria que vivemos tão intensamente!

À Coordenação do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agropecuária, na pessoa da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eliana Gertrudes Macedo Lemos que sempre esteve disponível e acessível. Esta é a oportunidade para manifestar minha imensa admiração e expressar os meus mais sinceros agradecimentos. Em seu nome, aproveito para agradecer a todo o Conselho do Programa e aos funcionários e funcionárias da Pós-graduação.

Ao Prof. Dr. Jaime Maia dos Santos, pela simplicidade, atenção, apoio e suporte técnico quando solicitamos sua ajuda. Obrigado por ceder a estrutura do seu laboratório para os bioensaios, pelas excelentes 'dicas', sempre nos alertando dos entraves a serem vencidos, além de ser um exemplo de profissional dedicado e extremamente capacitado.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Inês Tiraboshi Ferro e ao Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro, competentes profissionais, pelo apoio nos momentos mais difíceis de nossas vidas e, principalmente, por disponibilizarem o seu laboratório para a realização de alguns experimentos, todas as vezes que necessitei.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosangela Zacarias Machado, por ter me recebido tão bem em seu laboratório e ter me ajudado e me instruída com ótimas ideias. Do mesmo modo, agradeço à Marcia, estudante de mestrado do laboratório da professora Rosangela, pelo auxílio nos experimentos de Western Blotting.

À Dr<sup>a</sup>. Flávia Maria de Souza Carvalho, pela atenção, colaboração nos experimentos iniciais de expressão de proteínas e pelas sugestões nas correções deste trabalho.

Aos Professores Dr. Edgard Augusto de Toledo Picoli (UFV) e ao Dr. Fernando Hercos Valicente (Embrapa Milho e Sorgo). Vocês, que vieram de tão longe, agradeço imensamente pela oportunidade de revê-los e principalmente por contribuírem imensamente, com suas avaliações, questionamentos, sugestões e correções, para a melhoria da redação deste trabalho e para o meu próprio crescimento científico-profissional. Muito obrigada!

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Antonia do Carmo Barcelos Correia, por ter me ensinado os primeiros passos científicos, sem nunca ter deixado de me acompanhar na minha pequena trajetória científica. Agradeço principalmente por sua amizade e seu carinho.

Ao Bruno Flávio Figueiredo Barbosa, toda minha admiração e agradecimento por tudo que me ensinou e ajudou no laboratório de Nematologia da UNESP/FCAV. Agradeço pela presença constante no laboratório, de segunda a segunda, para vencermos as etapas finais deste meu trabalho.

À Vivian Boter Bergamasco, pela amizade e disponibilidade, sempre presente, e pela colaboração na realização dos Bioensaios.

Ao Julio César Bortolossi, pelo auxílio e sugestões de como proceder nos experimentos iniciais com expressão de proteínas.

À Agda e Juliana Vantini, amigas e sempre dispostas a ajudar todas as vezes que as requisitei com o sequenciamento de DNA.

Aos membros da banca de avaliação da qualificação: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Janete Aparecida Desidério Sena, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Inês Tiraboshi Ferro, Prof. Dr. Antonio Carlos Monteiro e ao Prof. Dr. Roberto Alves de Oliveira, pelas sugestões que contribuíram para o aperfeiçoamento deste estudo.

À Eliane Cristina da Cunha Alves pelo pronto atendimento, atenção e disposição.

Às minhas amigas de bancada, que em algum momento contribuíram e auxiliaram em partes deste trabalho: Deise Paula, Juliana Rossi, Suzana Marucci e Fernanda. Agradeço à vocês pela amizade, carinho e auxílio sempre que precisei.

A minha querida e eterna amiga Juliana Xavier Cordeiro por estar ao meu lado em todos os momentos da minha vida em Jaboticabal, tanto profissional quanto pessoal, compartilhando e somando sempre. E é lógico ao meu amigo Douglas (Assado) por fazer a Jú cada dia mais feliz.

Às amigas Lúcia Lopes, Larissa Scattolin e Camila Figueiredo (Camila das Índias), por serem colegas, amigas, ombro em todas as horas, companheiras e coro em todas as risadas.

Às inesquecíveis amigas que já passaram pelo laboratório: Elaine A. Cícero, Luciene Melo Coelho, Marta de Campos Neves, Juliana Costa e Viviane C. Vieira por suas amizades, carinhos e ajudas em todos os momentos, desde as mais maravilhosas reuniões até nos momentos mais difíceis.

Aos companheiros e companheiras do laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada: Ana Maria, André (Churras), Cláudio, Laura, Meire, Maria Gabriela, Najara, Thiago e Paula pela companhia e risadas durante todo o meu período de laboratório.

Aos docentes e funcionários do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária, em especial a D. Lucinda e ao Aldo, pelo companheirismo e contribuições.

Agradeço imensamente à cidade de Jaboticabal, SP, por ter recebido, eu e toda a minha família, de braços abertos, nos acolhendo em todos os momentos, em todos os aspectos, durante todos estes anos. Em especial, minha gratidão a todos os funcionários, professores e alunos das escolas que receberam meus filhos durante estes anos: CEVER, CIAF 1 "Luiz Antonio Bernal", Escola Estadual, agora Municipal, Senhora Aparecida, por onde meus filhos já passaram. Atualmente, em nome da Prof<sup>a</sup>. Antônia Eva Pimentel Ribeiro, agradeço à Escola Estadual Professor "Aurélio Arrobas Martins", onde meus filhos estudam atualmente. Vocês contribuíram imensamente para que eu pudesse ter tranquilidade e tempo para poder conseguir chegar ao objetivo final. A todos vocês que lutam por um ensino público e de qualidade, um forte abraço e minha eterna gratidão.

Agradeço à minha família, pequena em quantidade, porém enorme em qualidade: Inael e Marcella, vocês representam "tudo"! O Sol do amanhecer, a chuva do entardecer e a brisa de viver. Vocês simplesmente são tudo para mim! À minha irmã Elisângela, à minha sobrinha Gabriella, ao meu cunhado Fábio e minha querida Daniella Maria Alves Fernandes (prima-irmã), que apesar da distância, estiveram sempre presentes dando apoio e estímulo para que eu continuasse minha caminhada. Aos meus pais, Wilson e Maria José, por todo amor, pela educação, carinho, dedicação e reconhecimento. Vocês são maravilhosos, exemplo de vida!

À minha outra família, especialmente meus sogros D. Maria de Laia e Sr. Geraldo Filho, pelo carinho e pelas orações sempre.

A todos que, de alguma forma, direta ou indiretamente, me ajudaram e contribuíram para que eu atingisse mais essa etapa.

E, por último, mas nunca o último, agradeço a Deus por ter guiado meu caminho por linhas bem tortas que me fez aprender que nunca devo parar de confiar em Ti.

Sonha e serás livre de espírito... luta e serás livre na vida.

(Che Guevara)

## SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO .....	1
II. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
II.1. Controle Químico.....	4
II.2. Controle biológico de pragas.....	5
II.3. Biologia de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	7
II.4. Proteínas Cry produzidas por <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	8
II.5. Proteínas Cry com atividade contra nematoides.....	11
II.6. Detecção e isolamento de genes <i>cry</i> efetivos contra pragas.....	13
III. OBJETIVO.....	15
IV. MATERIAL E MÉTODOS .....	16
IV.1. Isolado bacteriano, meio de cultura e condições de cultivo.....	16
IV.2. Extração de amostras de DNA genômico de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	16
IV.3. Preparação da Sonda.....	16
IV.3.1. Condições de eletroforese.....	17
IV.4. Análise por Southern Blotting.....	18
IV.5. Construção da biblioteca genômica parcial contendo o fragmento de interesse .....	19
IV.5.1. Preparação dos vetores para a clonagem.....	19
IV.5.2. Análise da Biblioteca genômica parcial por meio de hibridação de colônia	20
IV.5.3. Estratégia de sequenciamento do gene utilizando a técnica de hibridação de colônias.....	21
IV.5.4. Validação dos plasmídeos recombinantes.....	22
IV.6. Estratégia de sequenciamento do gene utilizando caminamento cromossômico .....	23
IV.7. Clonagem dos produtos da PCR.....	24
IV.8. Clonagem no vetor de expressão.....	25
IV.8.1. Reação de amplificação.....	25
IV.8.2. Clonagem e transformação bacteriana.....	26
IV.9. Minipreparação de DNA Plasmidial (Método da lise alcalina).....	26

IV.10. Testes para confirmação da integridade e correta orientação dos transformantes.....	27
IV.11. Sequenciamento.....	28
IV.12. Expressão da proteína recombinante em <i>E. coli</i> .....	28
IV.12.1. Western-blotting.....	31
IV.13. Bioensaio com <i>Panagrellus redivivus</i> .....	32
IV.13.1. Delineamento experimental.....	32
IV.13.2. Extração de nematoides.....	33
V. RESULTADOS .....	35
V.1. Análise por Southern blotting e Construção da biblioteca genômica parcial contendo o fragmento de interesse.....	35
V.1.1. Análise por Southern blotting.....	35
V.2. Construção da biblioteca genômica parcial contendo o fragmento de interesse.	37
V.3. Análise da sub-biblioteca genômica por meio de hibridação de colônias.....	42
V.4. Sequenciamento dos clones positivos da biblioteca genômica parcial.....	45
V.5. Sequenciamento do gene por meio de caminhamento cromossômico.....	45
V.6. Amplificação, clonagem e expressão dos genes <i>cry</i> .....	52
V.6.1. Clonagem e ressequenciamento dos genes.....	52
V.7. Bioensaio com nematoides.....	68
VI. DISCUSSÃO.....	72
VII. CONCLUSÕES .....	80
VIII. REFERÊNCIAS .....	81

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1</b> Esquema ilustrativo de produção dos oligonucleotídeos específicos 133_Forward, 133_Reverse, Awayfrom3' e Awayfrom5'.....	23
<b>Figura 2</b> Seqüência do bioensaio com <i>Bacillus thuringiensis</i> em nematoides de vida livre. Etapas da montagem do bioensaio e a extração dos nematoides. Imagem A: dieta (água + aveia) preparada para receber os nematoides; Imagem B: suspensões esporos/cristais espalhadas e incorporadas em cada tratamento; Imagem C e D: Amostras individualmente submetidas a extração de nematoides.....	34
<b>Figura 3</b> Resultados das hibridizações das amostras de DNA dos isolados de <i>Bacillus thuringiensis</i> com as respectivas sondas. Nos painéis “A1” foram clivados 5 µg de DNA total e no painel “A2” clivou-se 10 µg do DNA total. No painel “A1”, “A2” foi aplicado DNA dos isolados 113 e 133, respectivamente. M = DNA do fago λ (lambda) clivado com HindIII.....	36
<b>Figura 4</b> Resultado da hibridização da amostra do DNA do isolado 123 de <i>Bacillus thuringiensis</i> com a respectiva sonda. No painel foi clivado 10 µg de DNA total. M = DNA do fago λ (lambda) clivado com HindIII.....	37
<b>Figura 5</b> Análise por “Southern blot” confirmando o fragmento de interesse aproximadamente de 4 kb.....	38
<b>Figura 6.</b> Aglomerados de moléculas de DNA genômico dos isolados de <i>Bacillus thuringiensis</i> durante o processo de extração no momento da precipitação.....	40

**Figura 7** Eletroforese em gel de agarose dos fragmentos gerados pela clivagem de 300 µg do DNA total do isolado 113 clivado com a enzima de restrição EcoRI. Painel 7 A: Consta o conteúdo da reação no gel; Painel 7 B: Região do fragmento de interesse excisada do gel. 1 kb = Marcador de tamanho molecular 1 kb DNA Ladder (Fermentas). M = lambda (λ) DNA clivado com HindIII.....41

**Figura 8** Sonda produzida a partir da amplificação com SP6 e T7 do fragmento clonado no vetor e posteriormente clivado com a EcoRI. 1 kb = Marcador de tamanho molecular 1 kb DNA Ladder (Fermentas); 1 = Sonda clivada com NcoI, 2 = Sonda clivada com XbaI; 3 = Sonda livre das pontas do vetor após clivagem com EcoRI; 4 = vetor pUC 19; M = Marcador de peso molecular 100 pb.....43

**Figura 9** Hibridização das colônias de DNA do isolado 113. Os pontos pretos indicam clones positivos, observa-se uma sensível melhora do “background”.....44

**Figura 10** Esquema ilustrativo da posição e direção de polimerização dos oligonucleotídeos 133\_Forward, 133\_Reverse, Awayfrom3' e Awayfrom5' no plasmídeo.....46

**Figura 11** Ilustração dos dois “contigs” (contig 1 e contig 2) obtidos após sequenciamento do DNA total do isolado 113 com os oligonucleotídeos Away from 3' e Away from 5'.....46

**Figura 12** Esquema ilustrativo da posição dos seis novos oligonucleotídeos nos “contigs”.....47

**Figura 13.** Análise eletroforética do produto da amplificação por PCR, utilizando os oligonucleotídeos individualmente. O marcador (M) se refere ao 1kb DNA Ladder (Fermentas).....48

**Figura 14** Esquema ilustrativo da posição dos três novos oligonucleotídeos no “contig” de 2.365 bases.....48

**Figura 15** Esquema ilustrativo que identifica as possíveis posições dos “contigs” 23 e 26 no gene em sequenciamento, bem como o provável número de bases a ser sequenciada para a completa caracterização do novo gene.....49

**Figura 16** Agrupamento de sequências gênicas obtidas pelo alinhamento múltiplo executado pelo programa blast. A sequencia obtida nesse estudo é indicada como ORF.....51

**Figura 17** Amplificações dos dois genes (isolado 113 e 133) gerando um fragmento único do tamanho esperado (3.516 pb) para os dois isolados. M: 1kb DNA Ladder (Fermentas).....52

**Figura 18** Padrão de restrição dos fragmentos obtidos após clivagem dos DNAs plasmidiais com a enzima de restrição NdeI. P: Plasmídeos não clivado; M: 1kb DNA Ladder (Fermentas).....53

**Figura 19** Mapa de restrição gerado através da ORF de 3.516 pb obtida, indicando as enzimas que cortam o fragmento. ....54

**Figura 20:** Amplificação com os oligonucleotídeos SUMO forward e T7 reverse. M: 1kb DNA Ladder (Fermentas).....55

**Figura 21** Análise eletroforética resultante de reações de PCR. Imagem “A”: resultados das amplificações com as combinações dos iniciadores SUMO F e o 920\_901. Imagem “B”: resultados das amplificações com as combinações com dos iniciadores T7 Reverse e 3873\_3895. M: 1kb DNA Ladder (Fermentas).....56

- Figura 22.** Análise eletroforética resultante de reações de PCR. Resultados das ampliações com as combinações dos iniciadores pETSUMO2\_F e away 5'. M: 1kb DNA Ladder (Fermentas).....57
- Figura 23.** Análise eletroforética resultante de reações de PCR. Resultados das ampliações com as combinações dos iniciadores pETSUMO2\_R e Left\_1276. M: 1kb DNA Ladder (Fermentas).....58
- Figura 24.** Sequência completa da ORF presente no isolado 113 composta por 3.516 nucleotídeos.....61
- Figura 25.** Sequência completa da ORF presente no isolado 133 composta por 3.520 nucleotídeos.....62
- Figura 26.** Sequência de aminoácidos predita a partir da ORF presente no isolado 113 composta por 1.172 códons.....63
- Figura 27.** Sequência de aminoácidos predita a partir da ORF presente no isolado 133 composta por 1.173 códons.....63
- Figura 28.** Eletroforese de proteínas totais de dois isolados de *Bacillus thuringiensis*, isolados 113 e 133, em gel de poliacrilamida-dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE) 10% corado com Coomassie Brilliant Blue. M: marcador molecular (KDa) PageRuler Unstained Protein Ladder (SM0661, Lote 00028137, Fermentas) e as posições relativas a 120 e 150 KDa estão destacadas.....65

**Figura 29.** Eletroforese de proteínas totais de dois isolados de *Bacillus thuringiensis*, isolados 113 e 133, em gel de poliacrilamida-dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE) 6% corado com Coomassie Brilliant Blue. 4 horas, 8 horas e 12 horas foram os tempos de multiplicação celular após a adição do indutor IPTG até a extração das proteínas totais. 18° C, 25° C e 37° C foram as temperaturas nas quais as amostras foram submetidas durante o tempo de multiplicação celular. 0,2, 0,4, 1,0 e 0,0 foram as concentrações, em mM, de IPTG adicionado em cada um dos pares de amostras. As barras horizontais indicam a abrangência do tratamento/condição de multiplicação celular. As flechas apontam para as bandas indicativas da proteína Cry produzida. M: marcador molecular (KDa) PageRuler Unstained Protein Ladder (SM0661, Lote 00028137, Fermentas) e as posições relativas a 120 e 150 KDa estão destacadas.....67

**Figura 30.** Visualização das bandas protéicas na membrana de nitrocelulose pelo Western-blotting com a construção plasmidial 133.6, induzidas com 0,2mM; 0,4mM; 1,0mM de IPTG, a 18°C. As amostras correspondem a: 1 - controle não induzido a 0,0 mM; I2 - amostra 133.6, induzida com 1mM de IPTG; 3 - amostra 133.6, induzida com 0,4 mM de IPTG; 4 - amostra 133.6, induzida com 0,2 mM. M: marcador de peso molecular de proteínas BenchMark™ Protein Ladder (Invitrogen).....68

**Figura 31.** Painel A: Porcentagem de mortalidade dos diferentes tratamentos ao longo do tempo. Painel B: Gráfico do tipo “Box plot” evidenciando as diferenças estatísticas entre os diferentes tratamentos. Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si estatisticamente entre si ao nível de 5% de significância pelo método de Tukey.....71

**ÍNDICE DE TABELAS**

	PÁGINA
.....	
<b>Tabela 1.</b> Relação de oligonucleotídeos iniciadores utilizados.....	29
<b>Tabela 2.</b> Resumo dos testes realizados para selecionar as construções com a correta orientação das sequências a serem submetidas aos testes de expressão.....	59
<b>Tabela 3.</b> Análise de Variância – ANOVA, utilizando delineamento em medidas repetidas, entre o percentual de nematoides mortos nos grupos controle e tratado, no período de 96 horas (numDF = graus de liberdade, F-value = valor de F calculado; p-value = nível de significância ajustado.....	69

**LISTA DE ABREVIATURAS**

A600 - absorvância em 600 nanometros

Amp - Ampicilina

APS - persulfato de amônia

$\alpha$  - alfa

cm - centímetros

cry - Corresponde aos genes de *B. thuringiensis*

Cry - Corresponde as proteínas de *B. thuringiensis*

CsCl – cloreto de césio

Cyt - endotoxinas citolíticas

°C - Graus Celsius

DL<sub>50</sub> – Dose letal cinqüenta

DNA - Ácido desoxirribonucléico

DNTPs - Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

DO - densidade ótica

$\delta$  - delta

EDTA - Ácido etilediamino tetracético

h – hora (s)

g – grama (s)

ICPs - Insecticidal Crystal Proteins

IPTG - Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo

kb - Quilo bases = 1000 pares de base

kg - Quilograma

L - Litro

LB - meio de crescimento "Luria – Bertani"

M - molar ou molaridade (mol/L)

mA - miliamperes

Mb - mega base

Mda - mega Daltons

mg - miligrama

mL - mililitro

mm - milímetro

mM - milimolar

min – minuto (s)

µg - micrograma

µL - microlitro

µM - micromolar (micromol por litro)

ng - nanograma

NCBI - National Center for Biotechnology Information

nm - nanômetro

OGM - organismo geneticamente modificado

ORF – Fase ou Quadro aberto de leitura

pb - pares de bases

PCR - Reação em cadeia da polimerase, do inglês “Polymerase Chain Reaction”

pH - potencial hidrogeniônico

pmoles - picomoles

RFLP - Polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição

rpm - Rotações por minuto

s – segundo (s)

SDS - dodecil sulfato de sódio

SDS - PAGE - gel de poliacrilamida em condições desnaturantes

Tris - tris (hidroximetil) aminometano

UV - Luz ultra - violeta

VIP - proteína inseticida de fase vegetativa, do inglês “Vegetative insecticidal protein”

V - Volts

X-Gal - 5-cromo-4-cloro-3-indolil- β-D-galactopiranosídeo

W - Watts

## IDENTIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E TESTE DE TOXICIDADE CONTRA NEMATÓIDES DE NOVOS GENES *cry* DE *Bacillus thuringiensis*

**RESUMO** - A produção de alimentos é prejudicada devido a incidência de diversas pragas e doenças. A fim de poder controlá-las, utilizam-se uma grande quantidade e variedade de produtos químicos. Em muitos casos, esses produtos incidem sobre uma vasta gama de organismos, fato este que causa um grande impacto no meio ambiente. A fim de minimizar os efeitos negativos do uso de produtos químicos com grande espectro de ação, há grande empenho no desenvolvimento de produtos cujos alvos sejam específicos. Neste sentido, o uso do controle biológico tem se apresentado como uma alternativa bastante interessante. Dentre os vários sistemas utilizados no controle biológico de pragas, a bactéria *Bacillus thuringiensis* é a opção de maior destaque. No entanto, inúmeros casos de resistência têm surgido ao longo destes últimos anos, devido aos produtos codificados pelos genes com ação entomopatogênica estarem sendo utilizados de maneira descontrolada. Desse modo, a busca por novas proteínas Cry é tarefa importante dentro da estratégia de controle biológico de pragas agrícolas. Com o intuito de se identificar novos genes *cry* por meio de análises de PCR Múltiplas, seguida de análise por RFLP, identificaram-se 3 isolados de *B. thuringiensis* cujos fragmentos de genes analisados diferiram entre si e das linhagens padrão conhecidas até o momento. Ao analisar essas sequências gênicas depositadas no GenBank, verificou-se que dois desses fragmentos de DNA pertencentes aos isolados 113 e 133 possuíam alta similaridade com os genes efetivos contra nematoides, uma terceira sequência caracterizada a partir do isolado 123 não foi similar a nenhuma outra sequência depositada no GenBank atualmente. Os isolados cuja sequência de aminoácidos de suas proteínas Cry predita “in silico” mostraram-se similares a genes *cry* previamente depositados no GenBank teve o respectivo gene caracterizado completamente. Para tal, foram utilizadas várias técnicas como biblioteca genômica, hibridação de colônias e caminhamento cromossômico. Essa biblioteca foi analisada utilizando o produto da PCR múltipla como sonda. Os clones positivos tiveram o seus

insertos sequenciados por meio de subclonagens e caminhamento cromossômico. Finalmente, dois novos genes *cry* foram caracterizados, clonados em vetor de expressão e suas proteínas foram expressas em linhagem apropriada de *E. coli*. A fim de verificar a nematotoxicidade dessas proteínas, um bioensaio foi desenvolvido utilizando nematoides de vida livre. Os resultados mostraram que a expressão das proteínas foi maior a 18°C, e confirmaram que não são expressas a 37°C, para todos os tempos de indução testados, além disso foi observado que a proteína clonada a partir do isolado 133 tem uma massa molecular maior que a proteína clonada a partir do isolado 113. Os testes dos bioensaios revelaram que os nematoides de vida livre avaliados foram suscetíveis a estas proteínas Cry analisadas, confirmando o fato previamente descrito que os nematoides podem ser alvos das proteínas Cry produzidas por isolados desta bactéria.

**Palavras-Chave:** controle biológico, caminhamento cromossômico, proteínas Cry, bioensaio.

## IDENTIFICATION, CHARACTERIZATION AND TOXICITY EVALUATION AGAINST NEMATODES OF NEW *cry* GENES FROM *Bacillus thuringiensis*

**Summary** – Food production is strongly harmed by a large amount of plant pests and diseases. Aiming to control these problems, a large quantity and variety of chemical compounds have been used. In many cases, these products cause a severe environmental impact over a wide range of non-target organisms. In order to minimize the negative effects of using chemical products with great action spectrum, there is a great effort to develop products of which targets are specific. Therein, the biological control has been presenting itself as a very interesting alternative. Among the various systems used in biological control, the bacteria *Bacillus thuringiensis* is the option pinpointed as the best notability. However, some resistance towards its use as a biological controlling agent have been reported recently due to the uncontrolled use of products decoded by genes of entomopathogenic action. Thus, the search of new Cry proteins is an important task inside the strategy of biological control of field pests. In order to overcome these situations efforts on the isolation and characterization of new *B. thuringiensis* isolates using molecular techniques such as PCR and RFLP were adopted and three *B. thuringiensis* isolates were compared among them and were considered different among the known and described standard type strains up to the present time. When part of the obtained gene sequences were compared to those deposited on the GeneBank, it was possible to observe that for two of them, isolate 113 and 133, a high degree of similarity with sequences described as active against nematodes; the third isolate, 123, had no similarity to any deposited sequence up to date. The isolates, which aminoacid sequence of their Cry proteins “in silico” were similar to cry genes earlier deposited on GenBank, had their respective gene fully characterized. To this, several techniques have been used including genomic library, colony hybridization and chromosomal walking. A genomic library was built for one of the isolates and the generated clones were PCR analyzed with the positive clones having their respective inserts sequenced after subcloning and using the chromosomal walking sequence technique. Finally, two new *cry* genes were characterized, cloned

using an expression vector and the respective proteins were expressed in appropriate *E. coli* strain, so as to evaluate the nematotoxicity by bioassaying them against free living nematodes. These results exhibited that the expressed proteins is higher at 18°C, and they are not expressed at 37°C for all induction time intervals analyzed. Besides, the expressed protein obtained from the isolate 133 has a higher molecular mass when compared to the one obtained from isolate 113. The bioassays revealed that the free living nematodes were sensitive to both analyzed Cry proteins confirming the previous description of them acting on nematodes.

**Keywords:** biological control, chromosomal walking, Cry proteins, bioassays.

## I. INTRODUÇÃO

Em decorrência das diversas atividades humanas, incluindo a agricultura, tem-se aumentado cada vez mais a preocupação em relação aos problemas ambientais. Fato que tem resultado na busca de uma melhor qualidade da produção agrícola, com um enfoque ecológico, e, na tentativa de alcançar uma alimentação mais saudável e livre de agrotóxicos.

A utilização desordenada do uso de inseticidas químicos e o crescimento populacional em nível mundial, principalmente nos países subdesenvolvidos, tem demandado uma maior produção de alimentos e, por consequência, um maior controle das pragas na agricultura. Portanto, qualquer política pública objetivando o aumento da produção de alimentos deve considerar o uso de insumos menos agressivos aos ecossistemas.

O uso contínuo de agrotóxicos tem propiciado a seleção de populações resistentes de pragas, obrigando os produtores a utilizarem doses cada vez mais elevadas (OOI, 1986). Além disso, a grande maioria dos inseticidas químicos destroem a fauna auxiliar, deixam resíduos na vegetação, e nos próprios alimentos, e, em inúmeros casos, contaminam o meio ambiente (FAN & HO, 1971). Portanto, é necessário reduzir o uso desses produtos a fim de garantir uma produção de alimentos de maneira mais sustentável ambientalmente e mais saudável aos consumidores. Nesse sentido, os agentes de controle biológico, são uma alternativa viável a esse fim (PRAÇA et al., 2004).

Dentre os agentes de controle biológico, a bactéria gram-positiva *Bacillus thuringiensis* Berliner (Eubacteriales: Bacillaceae) tem merecido destaque no controle de insetos. Trata-se de uma bactéria de solo (ALVES, 1998; POLANCZYK et al., 2008)

que, durante a sua fase de esporulação, produz inclusões cristalinas, chamadas proteínas cristal (proteínas Cry) ou  $\delta$ -endotoxinas (BULLA et al., 1980), que são tóxicas a larvas de insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Homoptera, Orthoptera e Mallophaga, bem como a outros grupos de organismos, tais como nematoides, protozoários e ácaros (SCHNEPF et al., 1998; CAPALBO et al., 2005). No entanto, proteínas Cry tóxicas a nematoides, protozoários e ácaros são muito raras.

A ação dessas proteínas se inicia com a autólise da bactéria, quando os esporos dormentes, resistentes ao calor, e os cristais de proteína são liberados no meio (SILVA-FILHO & FALCO, 2001; KUMAR et al., 2008; SCHWEMBER, 2008). Ao ser ingerida por um inseto suscetível, a proteína Cry sofre modificações e pode levar o inseto à morte. Por outro lado, naqueles insetos resistentes, e nos demais organismos, essas proteínas não causam nenhum tipo de dano.

Atualmente é possível encontrar um grande número de produtos comerciais no mercado à base de *B. thuringiensis*, tais como, Bactospeine, Thuricide, Dipel, Agree, Bactur, Teknar, dentre outros. Além disso, uma grande quantidade de plantas modificadas geneticamente com genes *cry* dessa bactéria pode ser encontrada, tanto lenhosas, como álamo (*Populus nigra*) (WANG et al., 1996) e *Eucalyptus camaldulensis* (HARCOURT et al., 2000), quanto espécies anuais, como o milho Maximizer™ da Novartis, o algodão Bollgard™ e a batata Newleaf™ da Monsanto (JOUANIN et al., 1998).

Muito provavelmente devido a sua alta especificidade (GLARE & O'CALLAGHAN, 2000; KARIM et al., 2000; BOBROWSKI et al., 2003; POLANCZYK & ALVES, 2003; BRAVO et al., 2007), é comum a ocorrência de resistência dos insetos aos bioinseticidas à base de *B. thuringiensis*, bem como às plantas geneticamente modificadas com genes *cry* (GOULD et al., 2002; TABASHNIK et al., 2008).

Considerando a necessidade de diminuição do uso de pesticidas químicos de largo espectro e altamente poluidores do meio ambiente, a ocorrência de resistência nas pragas economicamente importantes no mundo inteiro, diversos isolados de *B. thuringiensis* têm sido estudados a fim de sanar esses problemas e prover os

laboratórios com novos genes *cry*. Esses novos genes são úteis para a substituição daqueles genes cujas pragas passaram a ser resistentes, bem como para o controle daquelas para as quais ainda não se tinha descoberto um gene *cry* efetivo.

Recentemente, GONÇALVES et al. (2009), por meio do uso de Multiplex PCR seguida de clivagem com enzimas de restrição, identificou, dentre 44 isolados de *B. thuringiensis*, três com possíveis genes *cry* ainda não caracterizados. Esses três isolados apresentaram um fragmento de DNA amplificado com o mesmo tamanho que o amplificado na linhagem padrão. No entanto, após clivagem com as enzimas de restrição, verificou-se haver polimorfismos internos em relação à linhagem padrão. Após clonagem e sequenciamento desses três fragmentos de DNA polimórficos, verificou-se que dois deles apresentaram similaridade com o gene *cry032* (gi|17979619|gb|AAL50330.1|; e-value = 4e-94), efetivo contra nematoides (SUN et al., 1999), e *cry1Ea* (gi|1946622|gb|AAD04732.1|; e-value = 4e-94), efetivo contra lepidópteros (HUEHNE et al., 2005), enquanto que o outro fragmento, clonado a partir do terceiro isolado, não encontrou similaridade com nenhuma outra sequência depositada no banco de dados GenBank do NCBI.

Portanto a fim de contribuir com a descoberta por novos genes *cry* de *Bacillus thuringiensis*, buscou-se, neste trabalho, identificar, caracterizar, desafiar os novos genes *cry* de *Bacillus thuringiensis* contra nematoides e detectar sua sua eficácia.

## II. REVISÃO DE LITERATURA

### II.1. Controle Químico

A necessidade de utilização de pesticidas químicos no controle de pragas, surgiu com a necessidade de controlar formas de vida indesejáveis, tais como os insetos e doenças que causam imensos danos na quantidade e na qualidade da produção agrícola (JONATAN, 1989).

Durante muitos anos o controle de pragas utilizou-se essencialmente do uso de produtos químicos no intuito de eliminá-las, ignorando a fauna benéfica presente no agroecossistema. No entanto, apresenta desvantagens principalmente quanto ao aspecto ambiental, pois o uso desordenado desses produtos fez com que fosse gerada uma série de malefícios, como a resistência química dos insetos aos defensivos; mudança do "status" de algumas pragas, antes tidas como secundárias que passaram a causar danos significativos, além de desequilíbrios ambientais, pondo em risco a vida de outros animais e a saúde humana, principalmente pela contaminação dos alimentos e da água (PARRA et al., 2002).

De acordo com dados publicados pela Anvisa nos anos de 2008 e de 2009, mais de 15% dos alimentos no país tiveram resíduos de agrotóxicos em excesso. Segundo GUAZELLI, 2009, somente no Brasil, no ano de 2008, o país foi considerado o maior consumidor mundial de venenos agrícolas (733,9 milhões de toneladas), ultrapassando os Estados Unidos (646 milhões de toneladas). Em 2007, as vendas no Brasil significaram 5.372 bilhões de dólares e em 2008, 7.125 bilhões.

O uso intenso de produtos químicos na agricultura pode levar as pragas a se adaptarem a estes pesticidas, o que obriga a utilizar de novos produtos, possivelmente mais tóxicos e mais prejudiciais ao meio ambiente. Além disso, estes produtos causam

a destruição de inimigos naturais e intoxicação de homens e animais devido a poluição do meio ambiente (BANDEIRA, 2009).

À medida que o homem toma consciência de que os inseticidas também o prejudicam, ele procura recursos menos nocivos que possam ser igualmente eficientes no combate às pragas, mas, menos danosos ao restante dos seres vivos. Assim, devido o efeito potencial adverso ao meio ambiente associado à utilização excessiva de inseticidas químicos, métodos alternativos para o controle de pragas têm sido buscados pelo homem (PARENTE, 2007).

## **II.2. Controle biológico de pragas**

Muitos organismos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera, causam frequentes e sérios problemas para a produção de importantes espécies produtoras de alimentos (LIMA et al., 2002). Estima-se que cerca de 67.000 espécies de insetos causam danos às plantações, sendo as regiões tropicais, normalmente as mais pobres do mundo, as que mais sofrem com a alta incidência de pragas (HERRERA-ESTRELLA, 1999). Somente devido aos fitonematoides, as estimativas indicam perdas próximas a 100 bilhões de dólares anuais (SASSER & FRECKMAN, 1987).

Considerando esses fatos, perdas devido à incidência de pragas, e o crescimento populacional mundial, vê-se que medidas devem ser tomadas a fim de evitar o aumento da pobreza no mundo, uma vez que, estatísticas do ano de 2009 relatam que, devido à crise econômica mundial, o número de famintos ultrapassou, pela primeira vez, a marca de 1 bilhão de pessoas (FAO, 2009).

Logo, a crescente demanda da população humana por alimentos tem forçado um significativo aumento do uso de pesticidas na agricultura (SINDAG, 2003). Entretanto, mesmo com uma movimentação comercial de inseticidas em torno de US\$ 8,11 bilhões em 1997, as perdas de produção continuam altas (PEFERÖEN, 1997; DE MAAGD et al., 1999). Com relação aos nematocidas, os gastos também são elevados, pois em 1990 esses gastos foram estimados em 500 milhões de dólares, sendo que 50% desse valor foi gasto no controle de *Meloidogyne* spp. (NORDMEYER, 1992).

A busca por métodos alternativos de controle de pragas na agricultura pode levar a um aumento na produção de grãos, bem como contribuir para uma agricultura mais sustentável, com uma maior preocupação com a preservação do meio ambiente, fruto de uma menor aplicação de compostos tóxicos (BOBROWSKI et al., 2003). Neste contexto, os patógenos, predadores e parasitoides representam ferramenta importante no controle dessas pragas com um mínimo de impacto ao meio ambiente (PINTO & FIUZA, 2003).

A aplicação de inseticidas microbianos tem se destacado, dentre as estratégias de controle biológico utilizadas atualmente, principalmente, pelo menor custo desses produtos em relação a outros bioinseticidas (PARENTE, 2007). Além disto, o público consumidor está cada vez mais preocupado com a saúde e segurança, diante dos efeitos maléficos dos produtos químicos. A incorporação dessa forma alternativa como parte de um manejo fitossanitário reduz os riscos ambientais e públicos do uso de inseticidas sintéticos (ARCAS, 1996).

O uso de entomopatógenos (agentes capazes de provocar doenças em insetos) tem sido visto como uma alternativa para esse problema. A vantagem destes agentes entomopatogênicos é que eles são quase sempre específicos e apresenta baixa ou nenhuma toxidez aos vertebrados e insetos não alvos, ocorrendo naturalmente nos campos cultivados (SOUZA et al., 2008)

Um dos entomopatogênicos mais utilizados é a bactéria *Bacillus thuringiensis* (*B. thuringiensis*), que apresenta uma enorme vantagem em relação aos outros métodos: possibilita isolar e expressar suas proteínas em outros organismos por meio de transgenia. A manipulação genética deste patógeno pode promover novas linhagens potencialmente mais ativas (SOUZA et al., 2008).

Segundo SZEWCZYK (2006) e colaboradores, com a otimização das formulações a comercialização se intensificou surgindo diversos produtos, preparados a partir de diferentes subespécies de *B. thuringiensis*. Atualmente os EUA possuem cerca de 200 produtos registrados, sendo responsável por 2% do mercado mundial de inseticida, e mais de 90% do faturamento com bioinseticidas.

Estudos realizados por MONNERAT et al (2003) demonstrou que *B. thuringiensis* é capaz de circular endofiticamente dentro da planta. A bactéria endofítica pode ser utilizada como uma ferramenta promissora no controle de algumas pragas que vivem ou se alimentam no interior de plantas, como os insetos sugadores e até mesmo os fitonematoides.

### II.3. Biologia de *Bacillus thuringiensis*

A primeira descoberta de doenças em insetos causadas por *B. thuringiensis* data de 1901, quando o biólogo japonês Ishiwata descreveu uma bactéria esporulante responsável pela mortalidade de populações do bicho-da-seda, *Bombyx mori*. O pesquisador chamou essa nova bactéria de *Bacillus sotto*. Mais tarde, Ernst Berliner descreveu a mesma bactéria, isolando-a de lagartas da traça da farinha, *Anagasta kuhniella*, na Alemanha, em 1911. Em 1915, Berliner chamou-a de *Bacillus thuringiensis* devido ao local onde as lagartas foram encontradas (WHITELEY & SCHNEPF, 1986) e reportou a existência de cristais. Porém, a atividade destes ainda era desconhecida.

A bactéria *Bacillus thuringiensis* Berliner (*B. thuringiensis*) é uma bactéria de solo, gram-positiva, da família *Bacillaceae*, que se multiplica em aerobiose e é facultativamente anaerobia e pode ser encontrada nos mais variados ecossistemas (ALVES, 1998; POLANCZYK et al., 2008). Ela apresenta duas fases principais durante o seu ciclo de vida: uma de crescimento vegetativo na qual a bactéria se multiplica por bipartição, e outra de esporulação que consiste na diferenciação da bactéria em esporo. Essas bactérias são consideradas de ocorrência ubíqua (KRYWINCZYK & FAST, 1980) por terem sido isoladas de todas as partes do mundo, de diversos ecossistemas e de vários substratos, como o solo, água superfície de plantas, insetos mortos, teias de aranha e grãos armazenados (BRAVO et al., 1998).

Durante a fase de esporulação, essa bactéria produz proteínas que formam um cristal (SCHNEPF et al., 1998), as quais são classificadas em duas grandes famílias de toxinas, Cry ( $\delta$ -endotoxinas) e Cyt (CRICKMORE et al., 1998). As proteínas da classe

Cry, após serem ingeridas por um inseto, são solubilizadas no meio intestinal e ativadas pela ação de proteases. As toxinas Cry ativadas se ligam a receptores específicos presentes nas células epiteliais do intestino (BOONSERM et al., 2005) e, ao se ligar nesses receptores, a toxina sofre uma mudança conformacional necessária para a sua inserção na membrana. Após a inserção, a toxina forma poros de ligação ou canais, os quais causam um inchamento e conseqüentemente ruptura da célula devido à lise osmótica (KNOWLES & ELLAR, 1987). Este modo de ação confere a estas toxinas uma grande especificidade. O uso desta bactéria no controle biológico de pragas apresenta vantagens comparadas ao uso de agentes químicos de controle, uma vez que a sua ação contra as pragas é altamente específica, se comparada à maioria dos agentes químicos atuais, além de não afetar outros organismos não alvos, tais como plantas, animais domésticos e o próprio homem (LIMA et al., 2002). Por outro lado, os sítios de ligação, por serem muito específicos, representam um mecanismo de aquisição de resistência às  $\delta$ -endotoxinas (FIUZA et al., 1996; DE MAAGD et al., 1999), fato que enseja a busca frequente por novas toxinas.

#### **II.4. Proteínas Cry produzidas por *Bacillus thuringiensis***

Existem várias subespécies reconhecidas de *B. thuringiensis*. As mais utilizadas como agentes de controle biológico são as subespécies *kurstaki*, *israelensis* e *tenebrionis*, eficientes no controle de espécies de lepidópteros, dípteros e coleópteros, respectivamente. Os genes que codificam a produção destas proteínas estão contidos em grandes plasmídeos ou no próprio genoma principal (GLARE & O'CALLAGHAM, 2000) da bactéria.

Atualmente, uma grande quantidade de estirpes de *B. thuringiensis* foi isolada e caracterizada, e vários laboratórios, continuam procurando novas toxinas. Existem várias coleções espalhadas pelo mundo e estima-se que mais de 50.000 estirpes de *B. thuringiensis* já foram identificadas (MONNERAT & BRAVO, 2000). Dentre estas estirpes, existem aquelas que são eficazes contra diversas ordens de insetos

(lepidópteros, dípteros e coleópteros) e contra outro grupo de invertebrados (nematóides, ácaros e protozoários) (FEITELSON et al., 1992).

A efetividade de estirpes para controle de insetos é variável para cada espécie de inseto. A virulência das bactérias depende das suas diferentes características fisiológicas: produção de toxinas e enzimas; taxa de crescimento e de multiplicação; adequação ao hospedeiro e suscetibilidade (HABIB & ANDRADE, 1998).

Em 1998, CRICKMORE e colaboradores propuseram uma nova classificação das proteínas Cry, baseada na sequência de aminoácidos codificada pelos genes. Até então, a classificação levava em consideração o perfil de toxicidade da proteína Cry (CAPALBO et al., 2005). Entretanto, a semelhança na sequência de aminoácidos, geralmente, também indica uma similaridade no espectro de ação contra os insetos-alvo de uma proteína Cry (GRIFFITS & AROIAN, 2005). Atualmente existem mais de 340 diferentes genes *cry* e as proteínas Cry estão agrupadas em 55 classes (CRICKMORE, 2008), podendo ser encontrado até sete diferentes genes *cry* em um mesmo isolado de *B. thuringiensis* (MARTINEZ e CABALLERO, 2002). 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).

As proteínas Cry possuem duas regiões distintas compostas por protoxinas: uma porção amino-terminal (N-terminal), normalmente variável, associada à toxicidade da proteína e uma porção carboxi-terminal (C-terminal), sendo esta conservada e associada à formação do cristal (ARANTES et al., 2002; BRAVO et al., 2006). Baseado na comparação da sequência primária de aminoácidos, essas protoxinas podem ser reunidas em dois grupos, sendo que o primeiro compreende estruturas com 130-135 kDa e o segundo compreende proteínas, naturalmente truncadas, com 70-73 kDa. Independente do tamanho, a clivagem proteolítica é indispensável para a toxicidade.

A estrutura terciária de algumas proteínas (Cry1Aa, Cry3Aa, Cry3Bb, Cry4Aa, Cry4Ba, Cry2Aa, Cyt2Aa) foram determinadas por cristalografia de Raio X (LI et al., 1991; GROCHULSKI et al., 1995; MORSE et al., 2001; GALITISKY et al., 2001; BOONSERM et al., 2005, 2006). As estruturas tridimensionais descritas são similares e

são formadas por três domínios conservados. Cada um desses domínios é constituído por cerca de 200 resíduos de aminoácidos. As proteínas Cry produzidas por *B. thuringiensis* apresentam diferentes formas, podendo ser bipiramidais, cubóides, rombóides, ovóides, esféricas, ou ainda, sem forma definida (HABIB & ANDRADE, 1998).

Considerando esses fatos, pode-se supor que pequenas alterações de aminoácidos na região N-terminal dessas proteínas podem alterar sua especificidade a uma dada praga. BRAVO e colaboradores (2002) demonstraram que uma mutação na região N-terminal da proteína Cry1Ac afetou a ligação e a formação de poros dessa proteína em membranas de *Manduca sexta* e teve sua atividade inseticida *in vivo* diminuída. Outro exemplo é a proteína Cry22 que, inicialmente, foi identificada em um isolado de *B. thuringiensis* ativo contra formigas (Hymenoptera) (PAYNE et al., 1997). Subsequentemente, outras proteínas Cry22 foram caracterizadas com atividades contra certos coleópteros, Cry22Ab e Cry22Ba (assim como Cry22A). Essas proteínas possuem o mesmo peso molecular, em torno de 75 a 86 kDa. No entanto, a proteína Cry22A possui quatro repetições imperfeitas de aproximadamente 80 aminoácidos entre os resíduos 261 e 575 e Cry22Ba não tem essencialmente a primeira dessas repetições, ou seja, uma pequena variação nessa região foi capaz de alterar a sua especificidade (MAAGD et al., 2003). Adicionalmente, alguns genes *cry* apresentam toxicidade a mais de uma ordem de insetos, como por exemplo as proteínas Cry1I, tóxica a Lepidoptera e Coleoptera (TAILOR et al., 1992), e Cry1B, que é ativa a Lepidoptera, Coleoptera e Diptera (ZHONG et al., 2000).

Apesar do grande número de genes *cry* já caracterizados, três eventos podem justificar a procura por novas proteínas *cry* específicas: primeiro, a ocorrência de insetos resistentes no campo (TABASHNIK et al., 1996); segundo, devido algumas toxinas Cry compartilharem o mesmo sítio no receptor, competindo, desta maneira, por um mesmo local (VANRIE et al., 1989; FERRE´ et al., 1991; MASSON et al., 1995); e, terceiro, devido haver, ainda, uma grande quantidade de pragas importantes para as quais ainda não existe uma proteína Cry efetiva.

## **II.5. Proteínas Cry com atividade contra nematoides**

Os fitonematoides são pragas de difícil controle devido a sua biologia, por apresentar uma grande quantidade de hospedeiros alternativos e devido a problemas encontrados para a aplicação do controle químico, sendo que a erradicação é praticamente impossível. O tratamento químico é comumente tido como uma forma eficiente de controle dessas pragas. No entanto, a supressão da população de fitonematoides por meio de tratamentos químicos não tem longa duração. Ademais, os agrotóxicos utilizados no controle desses parasitas estão sofrendo sérias restrições devido ao seu alto poder contaminante do meio ambiente (BROWN et al., 1991), bem como, à sua baixa eficiência, uma vez que, com exceção dos fumigantes, os demais produtos não se movimentam no solo, sendo ativos somente no local onde foram aplicados, e por apresentarem, em alguns casos, período de carência maior que o ciclo fenológico da cultura ( BRODIE, 1971; STARR et al., 2002; SILVA & SANTOS, 2007).

Em relação aos custos, estima-se que o valor gasto no controle de nematoides pode equivaler a três vezes a soma dos gastos com o controle de insetos, fungos e plantas daninhas (BIRD & KALOSHIAN, 2003). Esses fatos, aliado ao elevado custo do controle químico e a crescente conscientização global da importância de preservação do meio ambiente e da saúde, têm sido proibitivos ao uso do controle químico para fitonematoides.

Por outro lado, os fitonematoides possuem uma grande facilidade de disseminação, sendo levados facilmente pela água (chuva, enxurrada, irrigação), por implementos e/ou por partes vegetais contaminadas (tubérculos, raízes, etc).

Uma outra dificuldade com os fitonematoides está relacionada a diagnose da doença. Frequentemente, tanto os danos causados como os sintomas da doença devido à infecção por fitonematoides podem ser confundidos ou agravados com outros problemas de ordem fisiológica, como estresse hídrico e/ou deficiência nutricional, e/ou pela ocorrência de pragas e outras doenças associadas. Essa confusão se deve a grande redução da capacidade de absorver água e nutrientes pelo sistema radicular. Com isso, quando se percebe os sintomas, normalmente não há mais o que se fazer (CORDEIRO, 2003).

Portanto, estratégias alternativas para controlar esta doença estão sendo desenvolvidas e implantadas com vistas a reduzir as populações de nematoides a níveis aceitáveis, capazes de causar o menor prejuízo possível (FREITAS et al., 2001).

Estudos pioneiros com *B. thuringiensis*, que causam toxicidade em nematoides de vida livre, têm levantado a possibilidade de que proteínas *cry* podem ser capazes de controlar fitonematoides e fornecer biocontrole contra estas doenças (LI et al., 2007).

Embora tenha sido demonstrado que algumas proteínas Cry de *B. thuringiensis*, são tóxicas para uma ampla gama de nematoides de vida livre, a atividade potencial destas proteínas contra fitonematoides ainda permanecem desconhecidas (CAPELLO, 2006).

SHARMA (1994) verificou que meios de cultura onde foram multiplicados *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* e *B. thuringiensis* var. *Israelensis* mostraram-se muito tóxicos a diferentes estágios do nematoide-do-cisto (*Heterodera glycines* Ichinohe, 1952). Noutro estudo, a endotoxina purificada foi relatada como tóxica a ovos de *Meloidogyne* sp. *in vitro* na concentração 1:10 (PRASAD et al., 1972). O nematoide causador de lesões (*Pratylenchus scribneri*) foi suscetível a *B. thuringiensis*, mas sua eficácia não foi determinada devido à fraca solubilidade dessas toxinas (BRADFISH et al., 1991). Já segundo ZUCKERMAN et al. (1993), o isolado CR-371 de *B. thuringiensis* apresentou controle sobre nematoides fitoparasitas, tanto para *M. incognita* quanto para *Pratylenchus penetrans* (SHARMA et al., 2003).

Considerando a facilidade em se transformar culturas agrícolas com genes *cry* atualmente, a identificação de genes que conferem controle contra fitonematoides e a sua posterior transferência para essas culturas poderia trazer grandes benefícios a natureza e ao homem, em geral. Algo dessa natureza poderia diminuir os custos de produção de alimentos, poderia permitir o plantio em áreas infestadas com esses parasitas além de diminuir consideravelmente a contaminação do meio ambiente e dos alimentos por pesticidas químicos altamente tóxicos. Como exemplo, pode ser citado que a expressão da proteína Cry6A em raízes de tomate transgênico reduziu a produção de ovos por *Meloidogyne incognita* de até 76% (LI et al. 2007), o que é um feito considerável em se tratando de fitonematoide.

Comparando com proteínas Cry efetivas, por exemplo, para lepidópteros, a estrutura e o modo de ação das toxinas Cry nematocidas não tem sido claramente compreendido. Na verdade, quase todos as toxinas Cry nematocidas registrado no GenBank são protegidos por patentes relacionadas (SICK et al., 1994; PAYNE et al., 1998; SCHNEPF et al., 1998). Somente os dados raros são apresentados. Fato este lamentável, pois a medida em que aumenta a evolução de proteínas Cry, também podem ter como alvo os nematoides (filo de invertebrados), que quase sempre tem sido ignorados.

## **II.6. Detecção e isolamento de genes *cry* efetivos contra pragas**

Com o advento da reação da polimerase em cadeia (PCR), a identificação de novos genes *cry* foi facilitada (WANG et al., 2003). Por meio desta técnica pode-se utilizar oligonucleotídeos iniciadores, degenerados ou específicos, para genes *cry* previamente caracterizados para amplificar e conhecer possíveis novos genes em *B. thuringiensis*. Normalmente, nesses estudos, a PCR permite identificar uma pequena região de um gene *cry* de aproximadamente 400 a 600 pb. Além disso, a PCR permite verificar tamanhos de fragmentos distintos, mas, *per si*, ela não permite comparar a estrutura primária desses fragmentos. Técnicas auxiliares devem ser utilizadas a fim de poder comparar com maior confiabilidade os diferentes fragmentos produzidos pela técnica de PCR. O uso da análise de polimorfismos de tamanho de fragmentos de restrição (RFLP) tem permitido, de maneira rápida e econômica, realizar essa comparação para um grande número de sequências obtidas por PCR. Em seguida, somente aqueles produtos da PCR que apresentaram diferenças para com o controle após análise pela técnica de RFLP são submetidos à clonagem e sequenciamento, a fim de verificar a sua constituição de nucleotídeos (KUO & CHAK, 1996; SONG et al., 2003; WANG et al., 2003; STOB DAN et al., 2004).

Apesar de essas etapas permitirem comparar os fragmentos de genes de *B. thuringiensis* com outros genes *cry* ou *cyt* depositados em bancos de dados genômicos (GenBank) e permitirem, em seguida, supor uma provável classe/função para o produto

desse gene, até essa etapa não se pode, ainda, obter conclusões definitivas a respeito do gene em questão. Portanto, faz-se necessário realizar análises complementares a fim de caracterizá-lo completamente e desafiar o seu produto contra importantes pragas agrícolas a fim de determinar o seu potencial como controle biológico.

Neste sentido, vários genes *cry* tem sido clonados, caracterizados e expressos em *Escherichia coli* e/ou em *B. thuringiensis* mutante para genes *cry* (*cryB*<sup>-</sup>) (CHAK et al., 1994; MOAR et al., 1994; KAO et al., 2003; HUANG et al., 2004; KUMAR & UDAYASURIYAN, 2004; BHALLA et al., 2005; KUMAR et al., 2005; SAUKA et al., 2005; BERÓN e SALERNO, 2007; SHI et al., 2007; ZHANG et al., 2007; ZHENG et al., 2007; BUKHARI & SHAKOORI, 2009). Em alguns desses estudos as proteínas produzidas foram purificadas e utilizadas em bioensaios e sua DL<sub>50</sub> foi determinada.

### III. OBJETIVO

#### Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo geral identificar, clonar e caracterizar novos genes *cry* em isolados de *Bacillus thuringiensis*, expressar as respectivas proteínas em *E. coli*, e determinar a toxicidade contra nematoides.

#### Objetivos Específicos

Sequenciar novos genes *cry* utilizando a técnica de caminhamento cromossômico;

Clonar os novos genes *cry* em vetor de expressão;

Testar os isolados de *B. thuringiensis* contra nematoides.

## **IV. MATERIAL E MÉTODOS**

### **IV.1. Isolado bacteriano, meio de cultura e condições de cultivo**

Cultivaram-se os isolados de *B. thuringiensis* 113, 123 e 133, pertencentes ao Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada do Departamento de Biologia Aplicada a Agropecuária da UNESP, Campus de Jaboticabal, em placas de Petri contendo Ágar Nutriente (3,0 g de extrato de carne; 5,0 g de peptona; 15,0 g de ágar; 1L de água, pH 6,8) por 12 h a 30 °C. As colônias obtidas foram inoculadas em 50 mL de meio BHI ("Brain Heart Infusion – médium"- Biobrás) e multiplicadas por 4,5 h a 30 °C sob agitação constante a 200 rpm.

### **IV.2. Extração de amostras de DNA genômico de *Bacillus thuringiensis***

O DNA genômico dos isolados 113, 123 e 133 foram extraídos utilizando o protocolo de extração descrito por WILSON (1987), com algumas modificações: no final da extração o DNA foi ressuspense em TE (10 mM Tris.Cl pH 8.0; 1 mM EDTA pH 8.0) contendo 10 µg/mL de RNase, não sendo necessário utilizar o CsCl.

### **IV.3. Preparação da Sonda**

Os fragmentos de DNA dos isolados 113, 123 e 133 previamente identificado por GONÇALVES et al. (2009), foram clonados no vetor pGEM – T Easy (Promega) e transferidos para *Escherichia coli* conforme metodologia descrita por SAMBROOK &

RUSSEL (2001). Os clones recombinantes de *E. coli* foram multiplicados em meio de cultura Luria-Bertani (LB) e os plasmídeos foram extraídos com o auxílio do conjunto de reagentes QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen), conforme as recomendações do fabricante. Antes de proceder à obtenção da sonda, alguns plasmídeos foram submetidos a um novo sequenciamento de DNA para a confirmação da identidade do inserto. Em seguida, os respectivos insertos de DNA, cuja identidade foi confirmada por sequenciamento de DNA no passo anterior, foram amplificados numa PCR com os seguintes constituintes: 1  $\mu\text{L}$  (100 ng/ $\mu\text{L}$ ) do DNA plasmidial, oligonucleotídeos universais T7 e SP6 (0,5  $\mu\text{M}$  de cada iniciador geral), 2,5 U de enzima *Taq* DNA polimerase (5 U/ $\mu\text{L}$  - Invitrogen), 5  $\mu\text{L}$  do tampão de reação 10X, 0,2 mM de dNTP, 1,5 mM de  $\text{MgCl}_2$  e água ultrapura q.s.p 50  $\mu\text{L}$ . As reações foram realizadas em um termociclador da marca MJ Research, modelo PTC-100<sup>TM</sup>, em um processo de amplificação composto por um período de desnaturação do DNA a 94°C por 5 min, seguido de 35 ciclos, sendo cada um dos ciclos composto por 30 s a 94°C, 30 s a 41°C e 1 min a 72°C. Ao final dos ciclos de amplificação as amostras foram submetidas a uma extensão final de 7 min a 72°C e, ao término, foram mantidas a 4°C até o momento da sua retirada do termociclador.

Após eletroforese em gel de agarose, as bandas de interesse foram excisadas e purificadas do gel com o conjunto de reagentes QIAquick Gel Extraction Kit Protocol (Qiagen). Os fragmentos de DNA obtidos foram utilizados como sonda nos experimentos de hibridações.

#### **IV.3.1. Condições de eletroforese**

Após as reações, 5 $\mu\text{L}$  de cada amostra de DNA foram misturados a 2  $\mu\text{L}$  de tampão de amostra (azul de bromofenol a 0,5% em glicerol 50%), aplicados em gel de agarose 1,5% em tampão TEB (Tris 0,4 M, EDTA 0,1M, Borato 0,01 M) e submetidas a uma corrente elétrica de 4 V/cm por cerca de 2 h. Em seguida, cada gel foi corado com Brometo de etídeo (EtBr) (10 mg/mL) (SAMBROOK & RUSSELL, 2001), visualizados

sob fonte de luz U.V e registrados por meio de um sistema de fotodocumentação digital (Gel Doc 2000 Bio-Rad).

#### **IV.4. Análise por Southern Blotting**

As amostras de DNA genômico de cada isolado foram clivadas independentemente, utilizando 5 e 10 µg do DNA, com com cada uma das enzimas de restrição EcoRI, HaeIII, HindIII, TaqI, HpaI e BamHI numa reação contendo: 5 µL de tampão 10X, 5 µL (10 U/µL) de cada uma das respectivas enzimas de restrição e água pura estéril para um volume final de 50 µL. Com exceção da enzima TaqI, que foi incubada a 65 °C, todas as demais reações foram mantidas a 37 °C por 12 h. Os fragmentos de DNA foram separados, em gel de agarose 1% em tampão TAE (tampão Tris-Acetato-EDTA) sem EtBr. Após uma corrida a 50 V por 3 h, o gel foi corado em EtBr e a sua imagem fotodocumentada sob a luz UV.

Para cada amostra foi feito um gel, onde na primeira canaleta aplicou-se o DNA de lambda clivado com HindIII, seguido respectivamente, por toda a quantidade de DNA total clivado com as enzimas EcoRI, HaeIII, HindIII, TaqI, HpaI e BamHI, nesta ordem.

Em seguida, as amostras de DNA clivadas foram transferidas do gel de agarose para membrana de náilon Hybond N+, de acordo com instruções do fabricante (Amershan Biosciences). A transferência ocorreu por capilaridade, durante um período de 16 h. Decorrido este tempo, a membrana foi retirada, revestida por um envelope de papel filtro e submetida a 80 °C por 2 h, para a fixação das moléculas de DNA na membrana. A fim de certificar-se da total transferência do DNA para a membrana, o gel foi corado com EtBr e observado sob a luz UV.

A marcação da sonda e o processo de hibridação foram realizados seguindo recomendação que acompanha o conjunto de reagentes “Kit DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II” (Roche).

Finalmente, a membrana foi colocada em contato com filmes de raios-X em suportes apropriados e armazenada a temperatura ambiente por 1 h. Decorrido esse tempo, o filme foi revelado utilizando o conjunto de reagentes GBX (Kodak) e analisado

visualmente sobre um transiluminador de luz branca. Quando necessário, foi realizada uma segunda exposição das membranas a filmes de raios-X por 24 h.

#### **IV.5. Construção da biblioteca genômica parcial contendo o fragmento de interesse**

Com o intuito de padronizar a metodologia para a construção das bibliotecas genômicas, iniciou-se o experimento com um único isolado, 113.

##### **IV.5.1. Preparação dos vetores para a clonagem**

O plasmídeo pUC19 foi eletroporado em células eletrocompetentes de *E. coli*, multiplicados e extraídos. Em seguida, foi linearizado por meio de clivagem com a enzima EcoRI e desfosforilado com a fosfatase alcalina de bactéria (CIP).

Amplamente usado em clonagem molecular, esses plasmídeos têm origem de replicação (ORI), um gene que atribui à bactéria resistência a ampicilina (AMP+) e uma parte do gene lacZ de *E. coli* (lacZ') que codifica um peptídeo da  $\beta$ -galactosidase. Nestes vetores o fragmento lacZ' foi modificado para conter um sítio de clonagem para diversas enzimas, incluindo EcoRI. A inserção de DNA neste sítio de clonagem inativa o gene lacZ' permitindo, assim, a identificação do clone recombinante pela cor branca da colônia de bactérias que contem o plasmídeo recombinante. Dois microlitros do vetor foram adicionados a 40  $\mu$ L de células eletrocompetentes DH10B e submetido à eletroporação. A estes foram adicionados 960  $\mu$ L de meio SOC [128,4  $\mu$ L de KCl (1M), 100,0  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> (1M), 100,0  $\mu$ L de MgSO<sub>4</sub> (1M) e 200,0  $\mu$ L de glicose (1M)] em tubos de 15 mL e incubados a 37°C, com agitação de 220 rpm, durante 1 h em agitador rotativo. Decorrido esse tempo, uma alíquota de 100  $\mu$ L da cultura foi transferida para placas contendo meio LB (Luria-Bertani) adicionado de ampicilina (50  $\mu$ g/mL), X-gal (40 mg/mL) e IPTG (100 mM). As placas foram devidamente identificadas e incubadas em estufa a 37°C, por 16 h.

Após o período de incubação foi possível observar várias colônias azuis, indicativas de carregar o vetor de interesse intacto. Quatro colônias foram transferidas para meio de cultura líquido LB líquido adicionado de ampicilina (50µg/mL) e multiplicado por 12-16 h, a 37 °C sob agitação constante a 220 rpm. Cada uma das quatro amostras, individualmente, teve seu plasmídeo extraído com o auxílio do conjunto de reagentes QIAprep Spin Miniprep Kit.

O vetor pUC19 (2,26 µg) foi clivado com a enzima EcoRI, defosforilado e purificado (SAMBROOK & RUSSEL, 2001). Do mesmo modo, o DNA genômico (300 µg) foi clivado com a enzima EcoRI, separado em gel de agarose e a região entre 2,0 e 4,0 kb foi purificada do gel. Em seguida, 1 µL (100 ng/µL ) de DNA do vetor, 3 µL de DNA genômico, 1 µL de enzima T4 DNA ligase, 4 µL de tampão 5X que acompanha a enzima (Invitrogen) e 11 µL de água ultra pura foram utilizados numa reação de ligação por 16h a 14 °C. Após este período, os plasmídeos recombinantes foram transformados em *E. coli* DH10B eletrocompetentes (SAMBROOK & RUSSELL, 2001) e semeadas em placa de Petri contendo meio de cultura Luria-Bertani (LB), suplementado com ampicilina 50 µg/mL, X-gal (40 mg/mL) e IPTG (100 mM). Após 12 h de crescimento a 37 °C, a presença de colônias brancas indicou sucesso no procedimento.

#### **IV.5.2. Análise da Biblioteca genômica parcial por meio de hibridação de colônia**

A fim de identificar dentro da biblioteca genômica parcial um clone carregando o plasmídeo com o fragmento de interesse, realizou-se uma série de hibridizações de colônias utilizando como sonda o respectivo fragmento de DNA, produzido e identificado conforme item IV.3.

Discos de membranas de nylon de 82 mm (Amersham Biosciences) foram colocados sobre a superfície das placas de Petri contendo as células recombinantes, produzidas conforme seção anterior. Em seguida, as membranas foram tratadas com as seguintes soluções: SDS 10% por 3 min, solução desnaturante (0,5N NaOH, 1,5M NaCl) por 5 min, solução neutralizante (1,5M NaCl, 0,5M Tris.Cl [pH 7.4]) por 5 min e, por último, na solução de SSC (2x) (v/v) por 5 min. Após estes tratamentos, a

membrana foi seca por 30 min, à temperatura ambiente, e, em seguida, foi mantida a 80 °C por 2 h, em forno, para fixação das moléculas de DNA na membrana. Enquanto isso, as placas contendo os clones foram retornadas à estufa, a 37 °C, por 4 a 6 h, para a multiplicação dos clones transferidos para a membrana. Após esse período as placas foram transferidas para refrigerador a 4 °C.

Após o processo de fixação do DNA à membrana, procedeu-se à hibridação. A sonda produzida conforme seção IV.3 foi utilizada em procedimento metodológico sugerido pelo fabricante do conjunto de reagentes utilizado para marcação, hibridação e detecção dos sinais, “Kit DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II” (Roche).

Por meio da comparação com os filmes de raio-X, as colônias positivas de cada placa de Petri foram isoladas, multiplicadas em meio de cultura LB (Luria-Bertani) e procedido à extração do respectivo plasmídeo recombinante.

#### **IV.5.3. Estratégia de sequenciamento do gene utilizando a técnica de hibridação de colônias**

Os plasmídeos recombinantes positivos, selecionados conforme seção anterior, foram sequenciados em equipamento ABI Prism 3100 (Applied Biosystems) com o conjunto de reagentes “Big Dye” versão 3.1 (Applied Biosystems) e com os oligonucleotídeos SP6 e T7, em reações separadas, compostas por: 2 µL de Big Dye Terminator v. 3.1, 2 µL de tampão (2,5X), 5 pmol de oligonucleotídeo (SP6 ou T7), 1,5 µg do DNA plasmidial. A amplificação foi realizada em 50 ciclos de 95 °C por 5 min, 95 °C por 30 s, 60 °C por 10 s e uma extensão final de 60 °C por 4 min. As reações de sequenciamento foram precipitadas pela adição de 80 µL de isopropanol 75% e incubação a temperatura ambiente por 15 min. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 4000 x g por 30 min, o sobrenadante descartado e o “pellet” lavado com 200 µL de etanol 70% a temperatura ambiente. Depois de centrifugadas a 4000 x g por 10 min, o sobrenadante das amostras foi descartado e o precipitado foi seco, no escuro, em fluxo laminar de ar por 1 h a temperatura ambiente e, então, submetido ao

sequenciamento. As sequências obtidas foram submetidas à análise com os programas phred/phrap/consed (GORDON et al., 1998; EWING et al., 1998; EWING & GREEN, 1998), juntamente com a sequência de DNA inicial, para que se desse a montagem do gene.

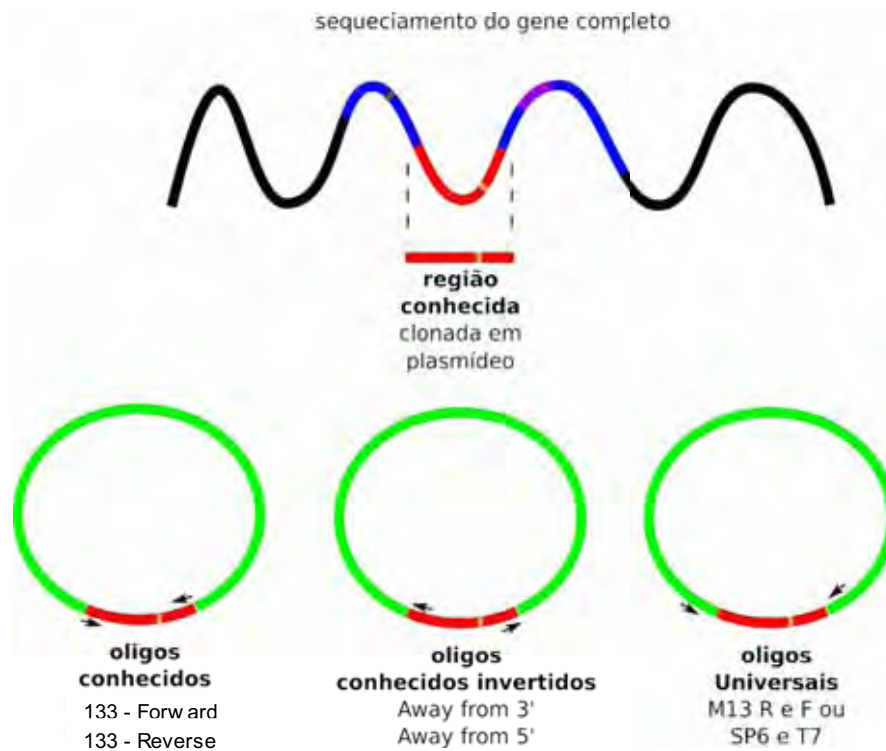
#### **IV.5.4. Validação dos plasmídeos recombinantes**

Com a finalidade de confirmar se os plasmídeos recombinantes possuíam o fragmento de DNA de interesse procedeu-se a uma PCR utilizando os iniciadores SP6 e T7 e em seguida a clivagem dos mesmos com a enzima de restrição EcoRI a fim de eliminar de partes do vetor. Os fragmentos foram separados e corados em gel de agarose conforme item IV.4. Em seguida, o gel foi submetido a uma depuração, a uma denaturação e procedido à transferência do DNA para membrana de náilon Hybond N+ de acordo com as instruções do fabricante (GE Healthcare).

Uma alíquota do DNA sonda (secção IV.3) foi submetida à marcação não-radioativa utilizando o conjunto de reagentes AlkPhos Direct RPN 3680 (GE Healthcare) e utilizada para hibridização ao DNA das membranas previamente produzidas. Todo o processo, desde a marcação da sonda até a lavagem da membrana após hibridização foi realizado utilizando o Kit AlkPhos DirectmRPN 3680 conforme as instruções do fabricante (GE Healthcare). A detecção dos sinais emitidos pela sonda foi realizada com o conjunto de reagentes Gene Images CDP-STAR RPN 3510 (GE Healthcare) conforme instruções do fabricante. Finalmente, a membrana foi colocada em contato com o filme de raio-X em suportes apropriados, armazenada a temperatura ambiente por 1 h e o filme foi revelado utilizando o Kit GBX (Kodak). A fotografia foi visualizada sob transiluminador de Luz branca.

#### IV.6. Estratégia de sequenciamento do gene utilizando caminhamento cromossômico

A partir da sequência de DNA dos isolados 113 e 133, que se mostrou similar ao gene *cry032* (GI:17979618), efetivo contra nematoide, foram produzidos dois oligonucleotídeos iniciadores, Away from 3' e Away from 5' (Tabela 1), complementares as pontas 3' e 5' dessa sequencia inicial, ancorados nas extremidades desse “contig” (grupo contíguo de sequências de DNA cuja sobreposição representa uma determinada região do cromossomo ou do genoma), de modo que a polimerização da nova sequência de DNA se desse no sentido saindo do “contig” rumo a parte do gene desconhecida (Figura 1).



**Figura 1.** Esquema ilustrativo de produção dos oligonucleotídeos específicos 133\_Foward, 133\_Rreverse, Away from 3' e Away from 5'.

Os oligonucleotídeos iniciadores foram elaborados através do programa Primer3 (ROZEN & SKALETSKY 2000) com os parâmetros padrão.

A partir de 0,5 µg de DNA total do isolado 113 foram realizadas reações de sequenciamento, tal como descrito anteriormente, exceto para a quantidade de DNA molde, com esses dois oligonucleotídeos, separadamente, sendo um mínimo de três reações para cada iniciador. As sequências obtidas foram submetidas à análise com os programas phred/phrap/consed (GORDON et al., 1998; EWING et al., 1998; EWING & GREEN, 1998), juntamente com a sequência inicial, para que se desse a montagem do gene.

A partir do “contig” gerado, novos iniciadores foram produzidos com a mesma característica: saindo da sequência conhecida rumo a parte do gene desconhecida. Novas reações de sequenciamento foram realizadas e nova montagem do gene realizada. Assim, sempre que se obteve um novo “contig” esse procedimento foi repetido.

#### **IV.7. Clonagem dos produtos da PCR**

Os fragmentos de DNA amplificados a partir de PCR com os iniciadores elaborados (Tabela 1) para o caminhamento cromossômico, que não se mostraram específicos, foram isolados do gel de agarose 1% e purificados com o conjunto de reagentes Pure Link™ Quick Gel Extraction (Invitrogen). Os produtos obtidos foram clonados em vetor pGEM-T Easy (Promega) e transformados por choque térmico em *E. coli* cepa DH10B (SAMBROOK & RUSSELL, 2001). Os clones recombinantes foram utilizados para a extração dos plasmídeos e uma clivagem com a enzima EcoRI foi realizada para verificar a presença dos fragmentos clonados e os seus devidos tamanhos, descartando os clones falso positivos.

Os transformantes validados foram multiplicados em 3,0 mL de meio de cultura Luria Bertani (LB) líquido. Após a multiplicação, o DNA plasmidial foi extraído e submetido ao sequenciamento com os iniciadores universais M13R ou M13F, conforme descrito acima. A sequência de nucleotídeos obtida foi utilizada para alinhamento com

outras sequências previamente conhecidas e disponíveis em bancos de dados, utilizando-se o programa Blast (ALTSCHUL et al., 1997).

## **IV.8. Clonagem no vetor de expressão**

### **IV.8.1. Reação de amplificação**

Produziram-se dois oligonucleotídeos iniciadores (113\_Cloning\_pETSUMO2\_F e 113\_Cloning\_pETSUMO2\_R) (Tabela 1) com base na sequência de bases do gene 113 de *B. thuringiensis* (sequência ainda não depositada no GenBank) de modo que a ORF completa fosse amplificada.

A reação de amplificação foi realizada em um volume total de 50 µL conforme a seguir: aproximadamente 100 ng da amostra de DNA total do isolado 113, 5,0 µL de tampão da PCR (10X PCR High Fidelity PCR buffer), 10 mM dNTP mixture (1,0 µl), 2,0 mM MgSO<sub>4</sub> 50 mM, 0,2 µM de cada oligonucleotídeo, 1U da enzima DNA polimerase Platinum® Taq High Fidelity (Invitrogen) e água bidestilada q.s.p 50 µL. Todos os componentes da reação foram adquiridos junto a empresa Invitrogen. A reação foi conduzida em termociclador (MJ Research - PTC 200) e consistiu em um passo inicial a 94 °C por 30 s seguido de 35 ciclos compostos por um passo a 94 °C por 30 s, 55 °C por 30 s e 68 °C por 1 min.

A Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity é uma mistura de enzimas contendo uma Taq DNA Polimerase e uma polimerase com atividade exonuclease no sentido 3'-5'. Esta atividade exonuclease é importante para a amplificação de fragmentos a serem expressos, uma vez que diminui a taxa de incorporação de nucleotídeos incorretos. Entretanto, devido a essa função reparadora, grande parte das moléculas de DNA amplificadas terão o nucleotídeo "A" extra, que é adicionado pela Taq DNA polimerase ao final das sequências amplificadas, removido. Essa remoção dificulta a clonagem do fragmento em vetores do tipo T/A (vetores que possuem um nucleotídeo T extra em seu sítio de clonagem). Assim, para aumentar a eficiência de clonagem, após o término da ciclagem, foi adicionado 0,5 unidades da enzima Taq DNA

polimerase ao produto de PCR e, em seguida, incubado por 5 - 10 min a 72°C. Esse passo adicional permite que a enzima DNA polimerase Taq adicione um nucleotídeo A ao final da sequência de DNA amplificada na posição 3', fato que facilita a clonagem nos vetores do tipo T/A.

Uma vez que os fragmentos de DNA iniciais obtidos a partir dos isolados 113 e 133 foram similares (GONÇALVES et al., 2009), repetiu-se os procedimentos dessa subseção também a partir do DNA total do isolado 133.

#### **IV.8.2. Clonagem e transformação bacteriana**

O produto da PCR obtido após amplificação do DNA total dos isolados 113 e 133, conforme a subseção acima, foi, individualmente, clonado no vetor de expressão pET-SUMO (Invitrogen).

Após ligação no vetor pET SUMO esses dois fragmentos foram transformados em células de multiplicação quimicamente competente de *E. coli* One Shot Mach1-T1R, que acompanha o conjunto de reagentes obtido junto a Invitrogen (Champion™ pET SUMO Protein Expression System) e, após confirmação da orientação correta e da correta inserção na fase de leitura do vetor de expressão, os plasmídeos foram transformados em *E. coli* BL21 (DE3), conforme instruções do fabricante (Invitrogen).

Em uma outra abordagem, ao invés de passar os plasmídeos pela *E. coli* One Shot Mach1-T1R, estes, após o procedimento de ligação, foram transformados diretamente para células quimicamente competentes de *E. coli* ER2566 (New England Biolabs, Inc.), linhagem esta que possui a característica de multiplicar, bem como de induzir o gene de interesse.

#### **IV.9. Minipreparação de DNA Plasmidial (Método da lise alcalina)**

Após transformação das células bacterianas e recuperação das construções transformantes, procedeu-se a extração do DNA plasmidial (SAMBROOK & RUSSELL,

2001) a fim de poder confirmar a integridade do inserto, por meio de clivagem com enzimas de restrição e por sequenciamento de DNA, e verificar a correta orientação da fase de tradução proteica.

As amostras foram quantificadas em gel de agarose e em NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer.

#### **IV.10. Testes para confirmação da integridade e correta orientação dos transformantes**

As construções recombinantes foram analisadas de diversas maneiras. Primeiramente, todas elas foram submetidas a clivagem com quatro enzimas de restrição (NdeI, EcoRI, EcoRV e HindIII). Essas enzimas clivam a sequência de DNA obtida a partir do isolado 113 em padrões específicos. Em seguida, o DNA das construções foi amplificado com os oligonucleotídeos iniciadores específicos para o vetor pET-SUMO (SUMO Forward e T7 Reverse) (Tabela 1), depois com os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a clonagem do gene (113\_Cloning\_pETSUMO2\_F e 113\_Cloning\_pETSUMO2\_R) e, finalmente, com uma combinação dos oligonucleotídeos específicos para o vetor com um iniciador que pareasse internamente ao gene, previamente utilizado para o sequenciamento. As combinações de oligonucleotídeos utilizadas foram: 1) SUMO Forward e 920 - 901; 2) SUMO Forward e 1038; 3) T7 Reverse e 3873 – 3895; 4) T7 Reverse e 3000 – 3020; 5) 1276 e 113\_Cloning\_pETSUMO2\_Reverse; e 6) 113\_Cloning\_pETSUMO2\_F e away 5'.

Ao final dessa etapa foi possível selecionar somente as construções cujos insertos apresentavam as características esperadas para o gene em questão. Esse mesmo procedimento foi realizado com as construções obtidas do isolado 133.

#### **IV.11. Sequenciamento**

A fim de confirmar, com absoluta certeza, que a fase de leitura para tradução da proteína estava correta e com o objetivo de descobrir a correta sequência de nucleotídeos do gene clonado, procedeu-se ao sequenciamento das construções previamente selecionadas com os oligonucleotídeos iniciadores que possuem sítio dentro do gene sequenciado mais os dois iniciadores específicos para o vetor de clonagem (Tabela 1).

As reações de sequenciamento constaram de 4  $\mu\text{L}$  de água bi-destilada estéril, 2,0  $\mu\text{L}$  de tampão de sequenciamento, 2,0  $\mu\text{L}$  de BigDye v. 3.1, 1,0  $\mu\text{L}$  (~1500 ng) de DNA e 1,0  $\mu\text{L}$  do respectivo oligonucleotídeo iniciador. As reações seguiram o ciclo de amplificação de acordo com a secção IV.5.3.

Após sequenciamento de DNA, os plasmídeos que estavam na orientação correta, na fase de leitura correta e que não sofreram nenhuma mutação artificial (mudanças na fase de leitura devido a erros da enzima no ato de amplificação a partir de DNA total) durante o processo de clonagem foram utilizados para os ensaios de expressão da proteína de interesse.

Os mesmos procedimentos acima foram utilizados para as construções advindas do isolado 133.

#### **IV.12. Expressão da proteína recombinante em *E. coli***

As construções selecionadas, em células de *E. coli* BL21 (DE3), foram submetidas a testes de expressão da proteína recombinante.

**Tabela 1.** Relação de oligonucleotídeos iniciadores utilizados

Oligonucleotídeos	Sequências 5' - 3'	Pos. gene <sup>1</sup>	Ord. <sup>2</sup>	Sent. <sup>3</sup>
Oligo_43_63	CATTACCgCAAACCCTCAAT	-		
Oligo_4372_4353	ACACCAAAAaggTggCTgAgT	-		
Oligo_425_406	TAAggCACgCATTgATTCTg	38-19	1	R
Oligo_670_651	TTgCCTggTTTCTAgCgAAT	283-264	2	R
113_347_369	AAgCAgATCCTACTAATCCAgCA	347-369	3	F
Oligo_920_901	TgCCCAAACACTgAAACATC	533-514	4	R
113_826_846	CTggggCCAACCTCTATAgTCA	865-845	5	R
LEFT_710	TTggATATAgTCATCgATTAAGTCA	1259-1283	6	F
RIGHT_755	AACgACCTggTTAgTgTAACATgA	1304-1281	7	R
133_Forward	CCATTggTgAgTTTgTgTCTTT	1490-1511	8	F
Away from 5'	ggTATCTTTgggTAATTggTgAg	1549-1527	9	R
RIGHT_1038	ATTCgTgCATCCCTACTggA	1589-1570	10	R
LEFT_1276	TTTggAAAgAgCACAgAAgg	1827-1846	11	F
Away from 3'	CggATgAATTTTgTCTggATg	1946-1966	12	F
133_Reverse	TCgCTTCgCATATTTgACTTT	2007-1987	13	R
RIGHT_1616	gCACTCATCAAaggTACCCAAT	2166-2148	14	R
LEFT_1901	TTCCCATCATTTCTCCTTgg	2451-2470	15	F
Oligo_3000_3020	TgTgAAAAgAgCggAgAAAA	2613-2633	16	F
Oligo_3479_3498	AgggATATggAgAgggCTgT	3092-3111	17	F
133.6_3245_3264	ACACTTCCCgTAATCgAggA	3245-3264	18	F
Oligo_3871_3852	CCACgATgAATgTTCCCTTCC	3484-3465	19	R
Oligo_3873_3895	CAGcGtGgAATTACTTCTTATgg	3486-3508	20	F
113_Cloning_pETSUMO2_F	ATggAgATAgTgAATAATCgAATCAA	1--27	ATG	F
113_Cloning_pETSUMO2_R	TTATTCCTCCATAAagAAgTAATTCCA	3517-3492	STOP	R
SUMO Forward	AgATTCTTgTACgACggTATTAg	pET SUMO	-	F
T7 Reverse	TAgTTATTgCTCAGcggTgg	pET SUMO	-	R

1 – refere-se à posição de pareamento dos oligonucleotídeos no gene sequenciado ou no vetor de expressão; 2 – ordem dos oligonucleotídeos ao longo do gene sequenciado; 3 – F = sentido direto e R = sentido reverso.

Inicialmente, as construções, duas a duas, foram estriadas em placas de Petri contendo meio de cultura LB sólido com 100 µg/mL de canamicina. Após 12 h de multiplicação, colônias isoladas foram transferidas para Erlenmeyers de 500 mL contendo 160 mL de meio de cultura líquido LB, TB ou M9 (SAMBROOK & RUSSELL, 2001) acrescidos de 100 µg/mL de canamicina. Quando a DO a 600 nm atingiu valores entre 0,6 e 1,0, 13 mL de cultura, de cada um dos três meios de cultura, foram transferidos para tubos de ensaio, previamente autoclavados, totalizando 12 tubos. Três tubos receberam 0,2 mM de IPTG cada um, três receberam 0,4, outros três receberam 1,0 mM e os três restantes não receberam IPTG. Em seguida, um grupo composto por

quatro tubos de ensaio, de cada um dos três meios de cultura, com todas as dosagens de IPTG (0,2, 0,4 e 1,0 mM), mais o controle (ausência de IPTG), foi transferido para uma estufa a 18 °C, sob agitação constante orbital a 250 rpm. Um outro grupo de quatro tubos, com as mesmas características, foi transferido para uma estufa a 25 °C sob agitação constante orbital a 250 rpm. Do mesmo modo, o último grupo de quatro tubos de ensaio restantes foi transferido para uma estufa a 37 °C também sob agitação constante orbital a 250 rpm.

Decorridos 4 h de incubação, uma alíquota de 4 mL de cultura foi coletada, assepticamente, de cada um dos tubos e armazenada a -80 °C. Com 8 h de incubação uma outra alíquota de 4 mL de cultura foi coletada, assepticamente, de cada um dos tubos e armazenada a -80 °C. Por fim, após 12 h de multiplicação, o restante de cultura de cada um dos tubos foi coletado e armazenado a -80 °C.

Em resumo, testaram-se três meios de culturas diferentes (LB, TB e M9), três temperaturas distintas de multiplicação bacteriana (18, 25 e 37 °C), quatro concentrações diferentes do indutor de expressão IPTG (0, 0,2, 0,4 e 1,0 mM) e 3 períodos de indução. Uma vez que cada lote de teste foi realizado para duas construções diferentes, os testes se deram em arranjo fatorial 3x4x3x3x2, perfazendo 216 amostras.

A verificação da expressão proteica se deu em gel SDS-PAGE por meio da análise de proteínas totais de cada uma das amostras previamente coletadas. Inicialmente, as células foram coletadas por meio de centrifugação a 10.000 x g em microtubos de 1,5 mL. Após descartar o sobrenadante, adicionaram-se 100 µL de tampão de amostra SDS-PAGE 1X (1,25 mL de Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8; 1,0 mL de Glicerol (100%); 0,2 mL de β-mercaptoetanol; 0,01 g de Azul de Bromofenol; 0,2 g de SDS; água estéril q.s.p 10 mL), ressuspenderam-se os péletes de células e manteve-se as amostras em banho de água em ebulição por 5 min. Na sequência, as amostras foram centrifugadas por 5 min a 12.000 x g e 20 µL de cada uma delas foram aplicados em um gel de poliacrilamida SDS-PAGE e submetidas a uma eletroforese a 8 V/cm, até passar pelo gel de empilhamento, e a 15 V/cm pelo restante da eletroforese (SAMBROOK & RUSSELL, 2001). A fim de descobrir qual seria a melhor resolução do

gel, testaram-se as concentrações de 12, 10, 8 e 6% de poliacrilamida. Uma vez que cada gel analisava 18 amostras mais dois padrões, 12 géis foram necessários, no mínimo.

#### **IV.12.1. Western-blotting**

Amostras do extrato bruto da construção 133.6 após a indução foram analisadas pelo Western-blotting (TOWBIN et al., 1979). As incubações foram realizadas utilizando anticorpo monoclonal Anti-His (GE Healthcare). As proteínas separadas no gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), descrito no item IV. 12, foram transferidas para a membrana de nitrocelulose (Bio-Rad), previamente incubada em tampão de transferência gelado (0,58% Tris pH 8,3, 20% metanol, 0,037% SDS e 0,29% glicina). Para isso, a membrana foi colocada no sistema de eletrotransferência “Mini Trans-Blot” (Bio-Rad), contendo o mesmo tampão, e a transferência foi realizada a 15V, “overnight”. A transferência foi visualizada na membrana de nitrocelulose pela coloração com solução de “Ponceau-S” (0,1% Ponceau-S e 10% ácido acético) por 5 minutos e descorada em água destilada.

A membrana de nitrocelulose foi incubada em TBS-Tween (10mM Tris-HCl pH 7,5; 150mM NaCl, 0,05% Tween-20) acrescido de 5% de leite em pó desnatado, por 12 horas, sob baixa agitação, para saturação de sítios de ligação inespecíficos. A membrana foi então incubada com anticorpo monoclonal anti-His diluído 1:3.000 em TBS-Tween e 5% de leite em pó durante 2 horas à temperatura ambiente, sob agitação lenta. Em seguida, foi submetida a três lavagens consecutivas de 10 minutos cada com a mesma solução.

Para a detecção do complexo antígeno-anticorpo, a membrana foi incubada em conjugado de camundongo acoplado à fosfatase alcalina (IgG de cabra anti-IgG de camundongo) diluído 1:30.000 em TBS-Tween. A membrana foi submetida a 3 lavagens, conforme descrito anteriormente, e a revelação se deu pela adição do substrato da enzima BCIP-NBT, utilizando-se o kit “Alkaline Phosphatase Conjugate Substrate” (Bio-Rad), de acordo com as instruções do fabricante.

## IV.13. Bioensaio com *Panagrellus redivivus*

### IV.13.1. Delineamento experimental

O bioensaio foi realizado com nematoides de vida livre *Panagrellus redivivus*, cedidos pelo Laboratório de Nematologia do Departamento de Fitossanidade da FCAV – UNESP. Para a realização do bioensaio cada isolado bacteriano foi cultivado em meio de cultura Agar Nutriente “NA” (extrato de carne 3 g/L, peptona bacteriológica 5 g/L e Ágar 15 g/L) e incubados a 30°C, durante 6 dias, permitindo assim completa esporulação e liberação de cristais.

Após este período, todo conteúdo bacteriano dos isolados 113 e 133, foram transferidos, com auxílio de alça de platina, para tubo Falcon contendo 10 mL de água Milli-Q autoclavada e 0,05% de Tween 20®. A suspensão obtida foi homogeneizada por agitação em tipo Vórtex e a partir desta, foram feitas duas suspensões seriadas, sendo a primeira  $10^{-1}$  e a segunda  $10^{-2}$ . A suspensão seriada  $10^{-2}$  foi utilizada para contagem de esporos em câmara de Neubauer, para padronização duas concentrações de  $1 \times 10^8$  esporos/mL e  $3 \times 10^8$  esporos/mL, que constituiu a suspensão já testada nos bioensaio de nematoides e lepidopetros.

A dieta dos nematoides foi preparada utilizando: Aveia (10 g) e água destilada autoclavada (10 mL), esta mistura foi homogeneizada e cada porção foi individualmente colocada em placas de Petri 60x15 estéreis (Figura 2), os quais incluíram controle (dieta contendo nematoide e água com tween e dieta contendo nematoide e água pura).

A população inicial de nematoides por 10 g de dieta por recipiente foi igual a 500. Um mililitro da suspensão de esporos das bactérias foram misturadas a um mililitro da suspensão contendo os nematoides e espalhadas sobre a dieta em cada recipiente. As placas com os tratamentos foram mantidas em câmaras climatizadas B.O.D sob temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Para cada isolado bacteriano, utilizaram-se dois níveis de inóculo e o delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com quatro tratamentos (dois níveis de inóculo e dois controles) com 10 repetições.

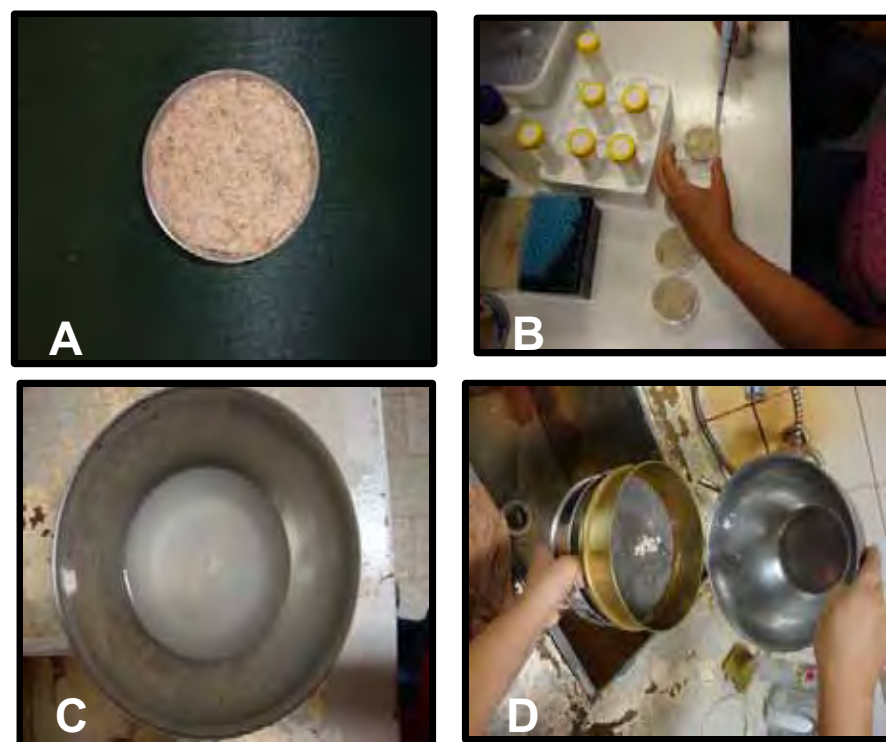
As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa estatístico R ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)) com os pacotes nlme (PINHEIRO et al., 2009) e multcomp (HOTHORN et al., 2008). Os dados foram transformados para atender os pressupostos da análise de variância (normalidade e homocedasticidade) e os testes de médias foram apresentados na escala original para facilitar a interpretação dos resultados. Um gráfico de caixas foi produzido para permitir uma análise visual do ajuste do modelo para os dados e para a identificação das diferenças entre os isolados e destes para as testemunhas. As comparações múltiplas foram efetuadas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

#### **IV.13.2. Extração de nematoides**

Para cada amostra foi retirada  $\frac{1}{4}$  da dieta e estas individualmente submetidas ao método de extração de nematoides conforme JENKINS (1964) com algumas modificações como se segue: a amostra da dieta foi colocada em uma bacia, contendo aproximadamente 300 mL de água e homogeneizada; o líquido sobrenadante foi vertido em peneiras de malha 60 mm (apenas ficam retidos resíduos grosseiros), sobre peneira de 500 mesh (com malha muito mais estreita, vai reter a matéria orgânica, os nematoides); a seguir o material da amostra foi lavado em água corrente por várias vezes até se obter uma coloração clara da água e sempre sendo o líquido vertido sobre o conjunto de peneiras. Com uma pisseta, lavou-se a peneira, recuperando-se os nematoides em água limpa.

Após 2h de decantação, o líquido sobrenadante foi eliminado cuidadosamente, e, uma suspensão de quatro mililitros foi obtida, diluída dez vezes, e em seguida foi realizada as estimativas populacionais dos nematoides extraídos da amostra ao microscópio fotónico, empregando-se para tanto lâminas especiais de contagem (Câmara de Petters).

Após 48 h do início do ensaio, foi realizada a primeira leitura de mortalidade até o 4º dia a partir da inoculação da bactéria por meio da quantificação de nematoides imóveis (mortos) e móveis (vivos), pela ação da bactéria *B. thuringiensis*. Os tratamentos foram avaliados nos períodos de 48, 72, e 96 h. Para efeito de análise estatística, os dados de contagem de imóveis foram transformados em porcentagem em relação ao todo, soma de mortos e de vivos, para cada repetição.



**Figura 2.** Seqüência do bioensaio com *Bacillus thuringiensis* em nematoides de vida livre. Etapas da montagem do bioensaio e a extração dos nematoides. Imagem A: dieta (água + aveia) preparada para receber os nematoides; Imagem B: suspensões esporos/cristais espalhadas e incorporadas em cada tratamento; Imagem C e D: Amostras individualmente submetidas a extração de nematoides.

## **V. RESULTADOS**

### **V.1. Análise por Southern blotting e Construção da biblioteca genômica parcial contendo o fragmento de interesse**

#### **V.1.1. Análise por Southern blotting**

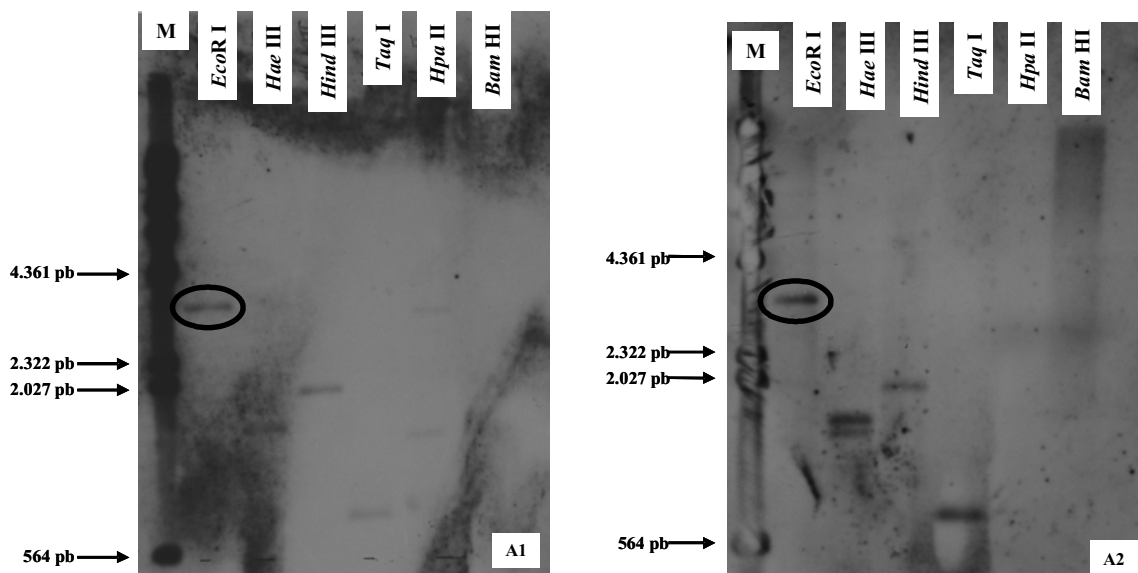
As hibridizações foram repetidas até obter resultados satisfatórios. Para tal, os três isolados foram multiplicados e seus DNAs genômicos extraídos pelo protocolo de MARMUR (1961). Essas extrações apresentaram um total de 150 µg de DNA, em um volume de 100 µL, em média, que era a quantidade suficiente para as análises.

A partir dessas preparações, 5 µg de DNA de cada isolado foram clivados com seis enzimas de restrição (EcoRI, HaeIII, HindIII, TaqI, HpaI e BamHI). Após o processo de hibridização, apenas o isolado 113 apresentou sinais no filme de raio-X (Figura 3 A1). Ao comparar com outros resultados anteriores pode-se observar que houve uma considerável melhora, após o aumento da quantidade de DNA total clivado. A emissão de fundo “background”, diminuiu consideravelmente. Além disso, na hibridização atual é possível ver bandas em cinco das seis enzimas. Por fim, a clivagem com a enzima EcoRI, apresentou uma única banda na altura de 4 kb.

A fim de verificar a causa das outras duas amostras de DNA, pertencentes aos isolados 123 e 133, não terem emitido nenhum sinal no filme de raio-X, após hibridização, um novo ensaio foi executado.

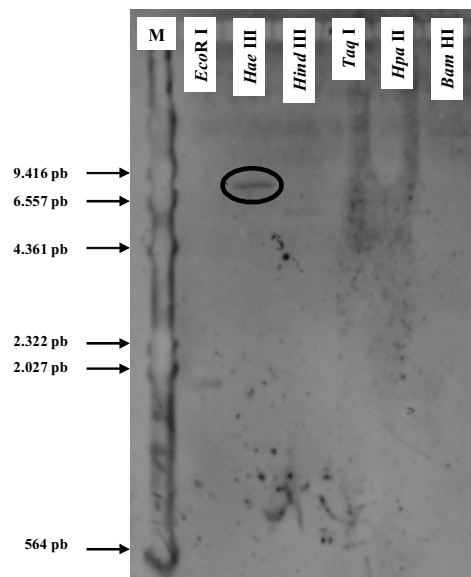
Ao elevar a quantidade de DNA total a ser clivada para 10 µg, finalmente, após o processo de hibridização e exposição à filme de raio-X, constataram-se bandas relativas às enzimas EcoRI, HaeIII e HindIII, para o isolado 123 (Figura 4). Nota-se que

todas as clivagens permitiram identificar uma única banda. Já para o isolado 133, observaram-se fragmentos nas quatro primeiras enzimas e uma única banda em torno de 4 Kb foi observada no filme de raio-X quando o DNA foi clivado com a enzima EcoRI (Figura 3 A2). Tal resultado coincide com o padrão de restrição para o isolado 113 (Figura 3 A1 e 3 A2), confirmando os resultados obtidos previamente por meio do seqüenciamento dos respectivos fragmentos de DNAs clonados no vetor.



**Figura 3** Resultados das hibridizações das amostras de DNA dos isolados de *Bacillus thuringiensis* com as respectivas sondas. No painei “A1” foram clivados 5 µg de DNA total e no painel “A2” clivou-se 10 µg do DNA total. No painel “A1”, “A2” foi aplicado DNA dos isolados 113 e 133, respectivamente. M = DNA do fago λ (lambda) clivado com HindIII.

Logo a banda proveniente da clivagem com EcoRI, marcada positivamente, foi purificada do gel e clonada em pUC 19.



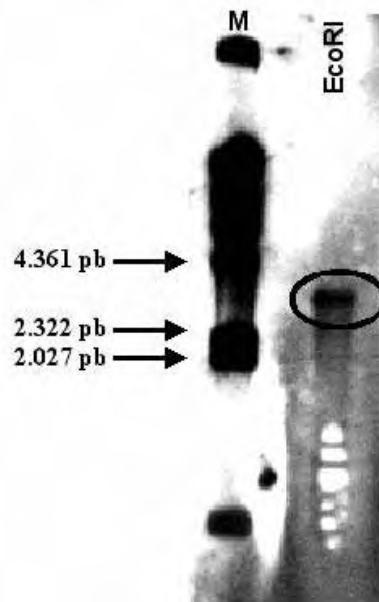
**Figura 4** Resultado da hibridização da amostra do DNA do isolado 123 de *Bacillus thuringiensis* com a respectiva sonda. No painel foi clivado 10 µg de DNA total. M = DNA do fago λ (lambda) clivado com HindIII.

## V.2. Construção da biblioteca genômica parcial contendo o fragmento de interesse

Os fragmentos de DNA do isolado 113, purificados da região do gel de agarose compreendida entre 2,0 e 4,0 kb (Figura 5) antes de serem clonados em vetor pUC 19 e eletroporados em *E. coli* eletrocompetentes, foram separados em gel de agarose, transferido para membrana de náilon e hibridizados com a sonda, confirmando a presença do fragmento de interesse nessa porção de DNA.

O vetor pUC 19 foi produzido, linearizado com EcoRI e desfosforilado para a geração de extremidades complementares aos fragmentos da biblioteca genômica e evitar religação do plasmídeo, respectivamente.

Após a preparação do vetor pUC 19, deu-se início à preparação dos fragmentos de DNA a serem clonados. Inicialmente, a partir da amostra de DNA do isolado 113 clivado com a enzima EcoRI, separada em gel de agarose, obtiveram os fragmentos compreendidos, entre 2,0 e 4,0 kb, devido a banda de interesse estar entre estes tamanhos.



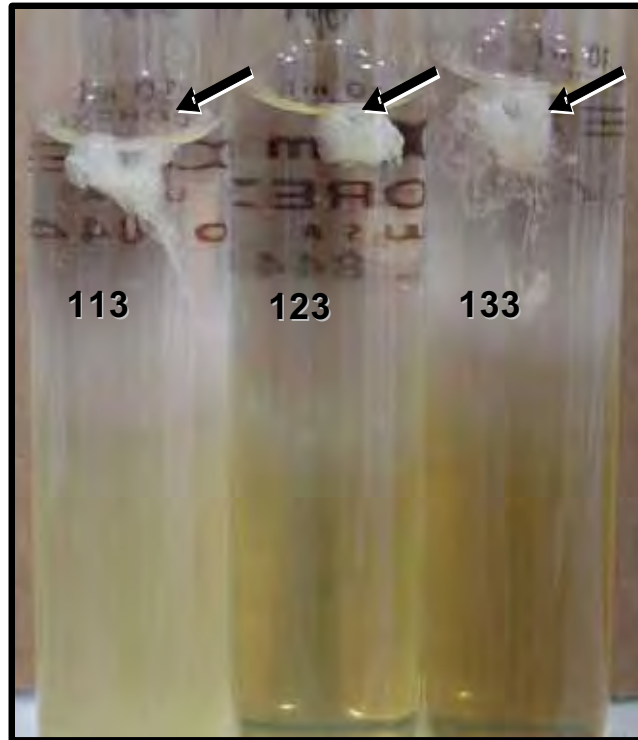
**Figura 5** Análise por “Southern blot” confirmando o fragmento de interesse aproximadamente de 4 kb. M:DNA do fago  $\lambda$  (lambda) clivado com HindIII.

Porém, alguns problemas foram notados ao longo do experimento. Primeiro a partir de 10  $\mu$ g de DNA clivados inicialmente não foi possível obter clones recombinantes, pois ora obtinha somente colônias azuis, ora não se obtinha nada. Segundo, ao aumentar a quantidade de ácidos nucléicos, apareciam clivagens parciais,

ou o DNA nem era clivado. Realizaram-se vários testes para obter-se uma melhor qualidade, como o aumento da quantidade de enzima em estudo, aumento do tempo de clivagem, troca da enzima por outras marcas. Porém, sempre era pouca a quantidade de DNA que a endonuclease clivava e, conseqüentemente, a quantidade de fragmentos recuperados do gel era muito pequena, não se alcançando sucesso nas clonagens.

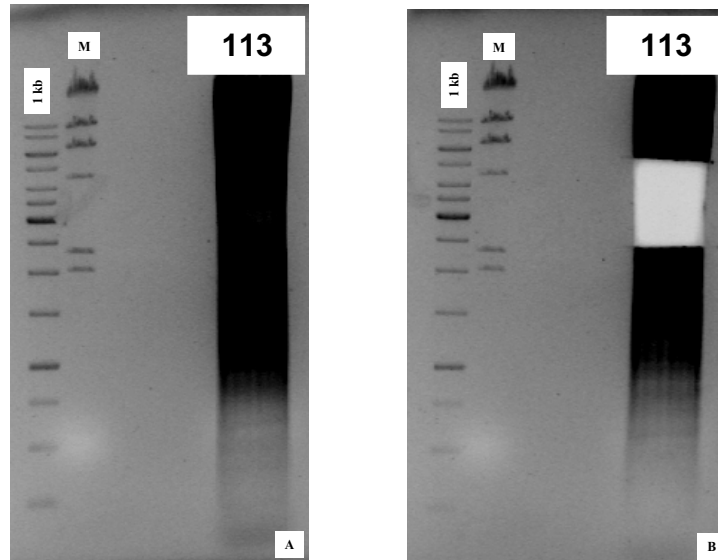
Alguns estudos mostraram que protocolos usados para preparação de DNA genômico de bactérias, que consistem no uso de lisozima e detergentes seguido de incubação e uma série de extrações com clorofórmio/ álcool isoamílico, antes do álcool, precipitam os ácidos nucléicos (MURRAY & THOMPSON, 1980). Além disso, tais procedimentos podem ser eficazes para remover contaminação por proteínas, porém não são eficazes para eliminar a abundância de exopolissacarídeos que são produzidos por muitos gêneros de bactérias, os quais podem interferir na atividade das enzimas de restrição e ligases. Diante desta informação, optou-se por extrair novamente o DNA total dos isolados 113, 123 e 133 utilizando o protocolo de extração de DNA sugerido por WILSON (1987), com algumas modificações: no final da extração o DNA foi ressuspenso em TE (10 mM Tris.Cl pH 8.0; 1 mM EDTA pH 8.0) contendo 10 µg/mL de RNase, não sendo necessário utilizar o Cloreto de Césio.

Os resultados iniciais da extração de DNA genômico com o protocolo de WILSON (1987) foram bem satisfatórios (Figura 6).



**Figura 6.** Aglomerados de moléculas de DNA genômico dos isolados de *Bacillus thuringiensis* durante o processo de extração no momento da precipitação.

Obteve-se uma excelente qualidade e quantidade de DNA (Figura 6), uma vez que a clivagem de 300  $\mu\text{g}$  deste ácido nucléico com a enzima EcoRI, produziu uma completa clivagem do DNA (Figura 7). Inclusive, a quantidade de DNA recuperado do gel de agarose (região entre 2,0 e 4,0 Kb) foi da ordem de 5  $\mu\text{g}$ , quantidade muito maior do que se obtinha anteriormente.



**Figura 7** Eletroforese em gel de agarose dos fragmentos gerados pela clivagem de 300  $\mu$ g do DNA total do isolado 113 clivado com a enzima de restrição EcoRI. Painel 7 A: Consta o conteúdo da reação no gel; Painel 7 B: Região do fragmento de interesse excisada do gel. 1 kb = Marcador de tamanho molecular 1 kb DNA Ladder (Fermentas). M = lambda ( $\lambda$ ) DNA clivado com HindIII

Após a obtenção do fragmento de interesse (2 a 4 kb) iniciou-se a construção da biblioteca genômica parcial do isolado 113. Ao final, foram executadas vinte e quatro eletroporações, sendo que cada uma delas deu origem a 1 mL de células recombinantes que foram divididos, proporcionalmente, em cinco placas de Petri, previamente preparadas conforme material e métodos, resultando num total de 120 placas. Considerando que cada placa produziu, em média, 100 colônias recombinantes, um total de 12.000 clones, aproximadamente, foram produzidos.

### V.3. Análise da sub-biblioteca genômica por meio de hibridação de colônias

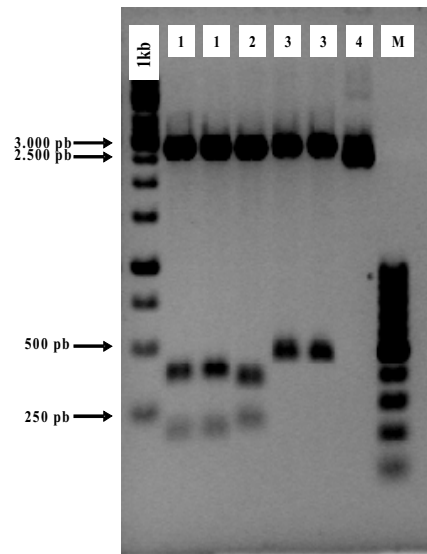
Com o objetivo de identificar aqueles clones que continham o gene de interesse, procedeu-se ao teste da biblioteca genômica parcial por meio da técnica de hibridação de colônias.

Nas primeiras sub-bibliotecas ocorreram alguns problemas. Num primeiro momento era impossível identificar algum clone positivo nos filmes de raio-X devido a grande emissão de fundo (Background).

O aumento da temperatura de lavagem, de 60 °C para 65 °C, resolveu esse problema. Passou-se a observar vários clones positivos no filme de raio-X. Esses resultados indicavam que a sonda poderia estar encontrando homologia não somente com os clones de interesse, mas também, com o vetor, pois colônias azuis também estavam dando resultados positivos.

Para confirmar essa suspeita, algumas das colônias positivas foram isoladas a partir das placas de Petri, multiplicadas e procedido à extração de DNA plasmidial. Estes foram clivados com a enzima EcoRI, aplicados em gel de agarose, transferidos para a membrana de náilon e hibridizados com a sonda. Como resultado observou-se que foram encontrados homologia com todos os plasmídeos e com alguns insertos.

A explicação se deve ao fato de a sonda ter sido produzida a partir de um vetor pGEM-T Easy, pois, com o uso dos oligonucleotídeos universais SP6 e T7 na produção da sonda, partes do vetor também foram copiados. Esse problema foi resolvido submetendo a sonda a uma clivagem com a enzima de restrição EcoRI seguida de uma purificação. Desta maneira, o fragmento de DNA que serviria como sonda ficou livre das pontas do vetor. Além disso, para que não houvesse dúvidas quanto a identidade da sonda, esta foi submetida à clivagens com as enzimas EcoRI, XbaI e NcoI. Conforme mapa de restrição para estas três enzimas, era esperado um fragmento para a enzima EcoRI (566 pb), dois para a enzima XbaI (359 pb e 207 pb) e dois para a enzima NcoI (385 pb e 181 pb), que foram obtidos, confirmando a pureza e identidade da sonda (Figura 8).



**Figura 8** Sonda produzida a partir da amplificação com SP6 e T7 do fragmento clonado no vetor e posteriormente clivado com a EcoRI. 1 kb = Marcador de tamanho molecular 1 kb DNA Ladder (Fermentas); 1 = Sonda clivada com NcoI, 2 = Sonda clivada com XbaI; 3 = Sonda livre das pontas do vetor após clivagem com EcoRI; 4 = vetor pUC 19; M = Marcador de peso molecular 100 pb.

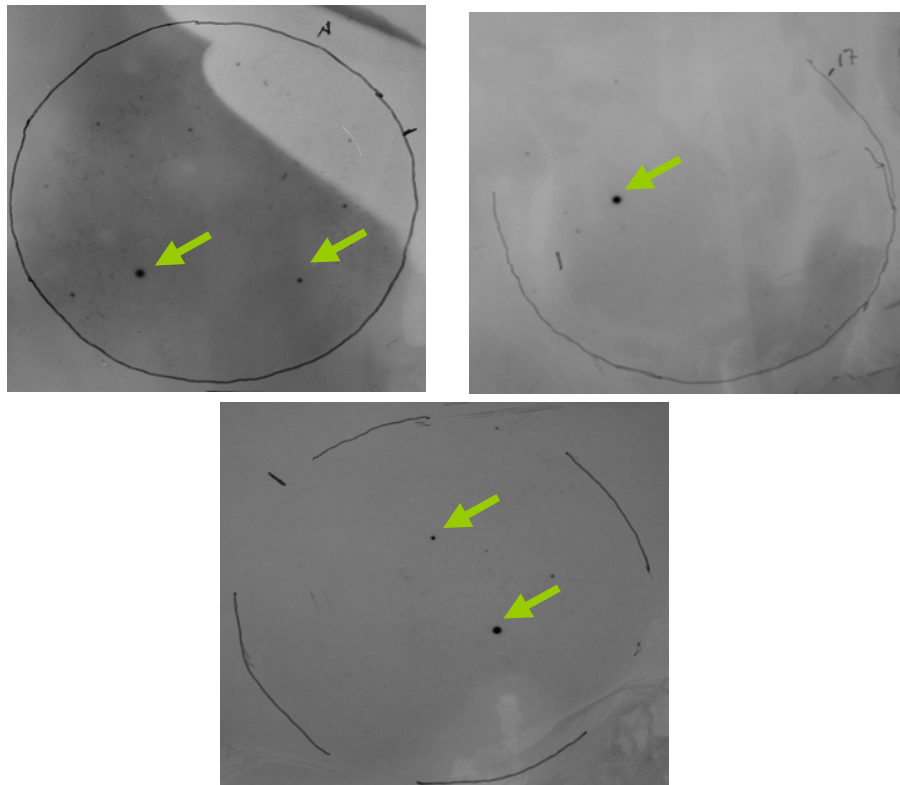
Desse modo, a sonda produzida a partir de amplificação do fragmento clonado no vetor com os oligonucleotídeos SP6 e T7 foi clivada com a enzima EcoRI e purificada a partir do gel de agarose, para só então ser utilizada nas hibridizações.

Os primeiros testes seguintes mostraram a especificidade da sonda, pois as placas apresentaram de um a dois clones positivos, o que era esperado, tanto devido a abundância do fragmento de interesse, quanto a dificuldade de se clonar fragmentos de 4 kb em vetor pUC19.

No entanto, a emissão de fundo ainda preocupava, dificultando a interpretação dos resultados. Na busca por melhorá-los realizaram-se três testes: no primeiro teste, duas membranas, foram mantidas em forno durante 2 h a 80 °C e em seguida foram submetidas à lavagens; no segundo teste, duas outras membranas foram submetidas a lavagem sem processo de fixação do DNA a mesma; e em um terceiro teste, duas

outras membranas foram submetidas a  $70.000 \text{ J/cm}^2$  por 2 min em um aparelho UV cross linker. A exceção do processo de fixação do DNA na membrana, todos os passos anteriores foram realizados conforme (SAMBROOK & RUSSELL, 2001). Já o processo de hibridação foi realizado conforme sugestão do fabricante dos conjuntos de reagentes utilizado para a marcação, hibridação e detecção do sinal.

Quando estes três testes foram submetidos à marcação, hibridação e detecção observou-se uma sensível melhora quando a membrana foi submetida à fixação do DNA em um aparelho UV cross linker (Figura 9).



**Figura 9** Hibridização das colônias de DNA do isolado 113. Os pontos pretos são os clones positivos, observa-se uma sensível melhora do “background”.

#### **V.4. Sequenciamento dos clones positivos da biblioteca genômica parcial**

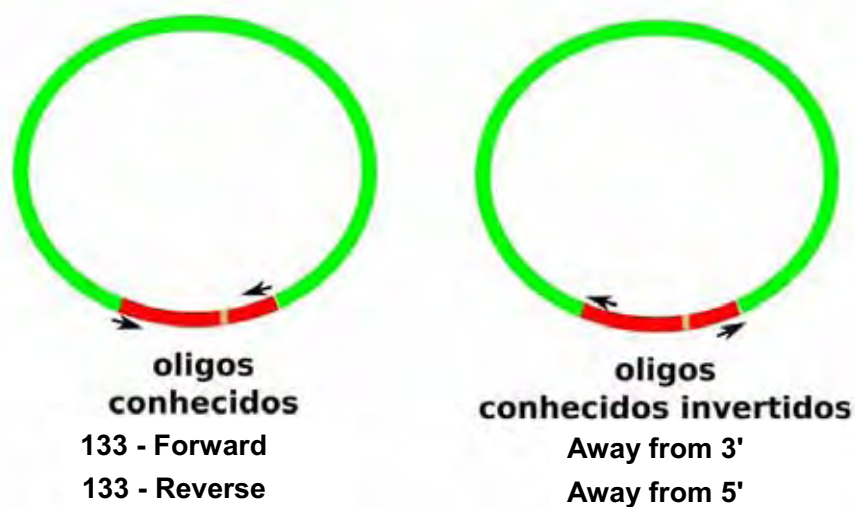
A biblioteca genômica parcial possibilitou obter 60 clones recombinantes positivos. No entanto, grande parte das sequências obtidas a partir dos mesmos não foram aproveitáveis. Os cromatogramas apresentaram muitos picos em uma mesma posição, um indicativo de contaminação da reação com várias sequências diferentes.

A fim de tentar resolver esses problemas, produziram-se quatro oligonucleotídeos específicos para a sequência previamente conhecida: 133\_Forward, 133\_Reverse, Away from 3' e Away from 5' (Tabela 1, Figura 10), os dois primeiros serviriam para confirmar a presença dessa sequência nos 60 clones e os dois outros serviriam para sequenciar as regiões que flanqueiam essa sequência. Dos 60 clones selecionados por meio da técnica de hibridação de colônias, 32 produziram amplificação por PCR quando se utilizaram os iniciadores específicos internos à sequência (133\_Forward e 133\_Reverse). O sequenciamento desses clones com os oligonucleotídeos Away from 3' e Away from 5' também resultaram, na sua grande maioria, em cromatogramas com muitos picos numa mesma posição, confirmando uma possível contaminação de sequências. Uma vez que as poucas sequências boas obtidas, ou eram iguais à sequência já conhecida, não incrementando seu tamanho já conhecido, ou não apresentaram similaridade com nenhuma sequência de gene *cry* depositada no Genbank, procurou-se uma nova alternativa para o sequenciamento do gene.

#### **V.5. Sequenciamento do gene por meio de caminhamento cromossômico**

O primeiro passo dessa nova estratégia foi testar os oligonucleotídeos 133\_Forward, 133\_Reverse, Away from 3' e Away from 5' (Tabela 1, Figura 10) em reações contendo DNA total do isolado 113. Esse teste possibilitou verificar a especificidade desses iniciadores e a possibilidade de haver outros genes *cry* similares nesse mesmo isolado. Após análise das sequências obtidas, foi possível verificar que o sequenciamento foi exitoso, possibilitando obter mais dois “contigs”, além do já obtido:

um de 200 e outro de 430 bases, ambos similares a genes *cry* (Figura 11), sendo que, ao compara-los com genes *cry*, os três alinhavam conforme mostrado na Figura 11 formando dois “gaps”.



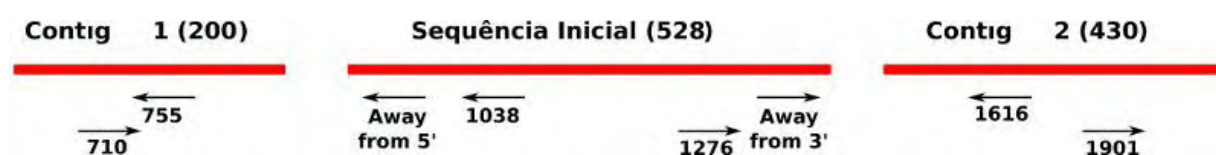
**Figura 10** Esquema ilustrativo da posição e direção de polimerização dos oligonucleotídeos 133\_Foward, 133\_Reverse, Away from3' e Away from5' no plasmídeo.



**Figura 11** Ilustração dos dois “contigs” (contig 1 e contig 2) obtidos após sequenciamento do DNA total do isolado 113 com os oligonucleotídeos Away from 3' e Away from 5'.

Na sequência, outros seis oligonucleotídeos, 710, 755, 1038, 1276, 1616 e 1901 (Tabela 1 e Figura 12), foram produzidos, sendo quatro deles com o objetivo de fechar os dois gaps existentes e dois objetivando estender as extremidades desses “contigs”.

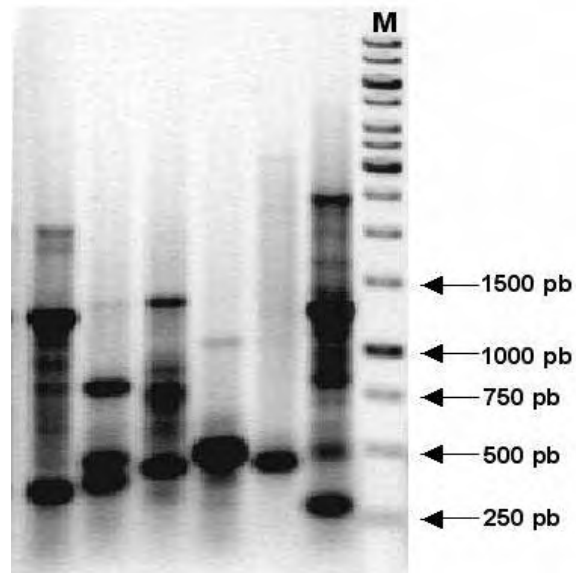
A formação dos “gaps” se deveu ao fato de os dois oligonucleotídeos, Away from 5' e Away from 3', estarem localizados muito próximos às respectivas extremidades da sequência. Desse modo, os novos oligonucleotídeos foram ancorados mais internamente à sequência (Figura 12).



**Figura 12** Esquema ilustrativo da posição dos seis novos oligonucleotídeos nos “contigs”.

No entanto, as reações de sequenciamento não ficaram boas, uma vez que apresentaram uma grande quantidade de indefinições (Ns) e baixa qualidade, identificada pelos programas phred/phrap/consed. Diante disso, um teste foi executado, realizando PCRs com os oligonucleotídeos individualmente. Para surpresa, mesmo sendo utilizados de maneira individual, esses iniciadores produziram amplicons dos mais variados tamanhos (Figura 13).

Dessa forma, os fragmentos amplificados por PCR, com cada um desses seis iniciadores, com tamanhos de, aproximadamente, 850 pb foram purificados do gel de agarose, clonados no vetor pGEM-T Easy (Promega) e transformados em células de *E. coli* DH10B. Após multiplicação e extração plasmidial, procedeu-se ao sequenciamento utilizando os oligonucleotídeos universais M13F ou M13R. Após a análise das sequências pelos programas phred/phrap/consed foi possível visualizar um contig de 2.365 bases, sem “gaps”. Uma análise no GenBank, por meio da ferramenta Blastn, mostrou ser ele similar a genes *cry*.



**Figura 13.** Análise eletroforética do produto da amplificação por PCR, utilizando os oligonucleotídeos individualmente. O marcador (M) se refere ao 1kb DNA Ladder (Fermentas).

A partir desse “contig” foram sintetizados outros 3 oligonucleotídeos, 920\_901, 3000\_3020 e 3479\_3498 (Tabela 1 e Figura 14).



**Figura 14** Esquema ilustrativo da posição dos três novos oligonucleotídeos no “contig” de 2.365 bases.

Tal qual ocorreu com os seis oligonucleotídeos anteriores, os resultados do sequenciamento direto não foram satisfatórios, apresentando as mesmas características. Assim, do mesmo modo que para os anteriores, foram realizadas PCRs, com os iniciadores individualizados, e as bandas amplificadas foram clonadas, multiplicadas e sequenciadas utilizando os iniciadores universais M13F ou M13R. A partir desses dados foram obtidos dois “contigs”, um de 581 bases (contig 13) e um de 2.801 bases (contig 26), sendo que ambos tinham similaridade com genes *cry*.

Seguindo na estratégia de caminhamento cromossômico, outros três iniciadores, 43\_63, 425\_406 e 670\_651, foram produzidos com base no “contig” 13 (Tabela 1). Após os mesmos procedimentos realizados anteriormente, para os outros oligonucleotídeos, uma vez que o sequenciamento direto com esses iniciadores também não foi bom, observou que ocorreu um novo acréscimo nesse “contig”, o qual passou a ser denominado “contig” 23 com 724 bases (Figura 15). A análise dessas sequências no GenBank com a ferramenta Blastn mostrou serem elas similares a genes *cry*. Na sequência representada pelo “contig” 23 foi possível identificar o início da ORF (ATG), fato confirmado quando se realiza uma análise com a ferramenta Blastx, uma vez que essa região é alinhada com outras regiões iniciadoras da transcrição presentes em diversos outros genes *cry*. Juntando os dois “contigs”, 3525 bases haviam sido sequenciadas. Do mesmo modo, por similaridade com genes *cry*, foi possível supor que existiam aproximadamente 120 bases entre o “contig” 23 e o 26 e que mais 500 bases, aproximadamente seriam suficientes para chegar ao final do gene (Figura 15).



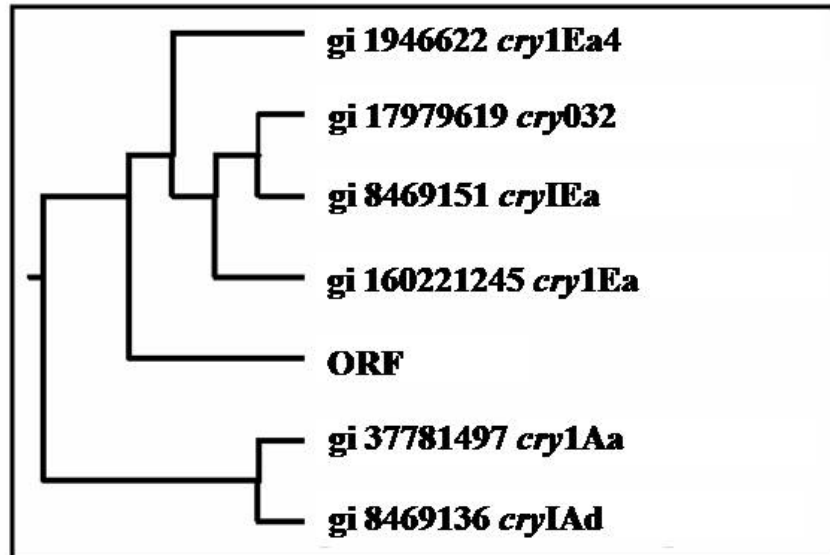
**Figura 15** Esquema ilustrativo que identifica as possíveis posições dos “contigs” 23 e 26 no gene em sequenciamento, bem como o provável número de bases a ser sequenciada para a completa caracterização do novo gene.

Para chegar ao códon de parada e eventual fechamento do gap realizaram-se PCRs com os oligos 43\_63, que está ancorado, no sentido 5'-3', na extremidade do “contig” 23 mais próxima do contig 26, e 920\_901, que está ancorado, no sentido 3'-5', na extremidade do “contig” 26 mais próxima do “contig” 23. A banda resultante dessa amplificação foi purificada, clonada em pGEM-T Easy e, após a multiplicação do clone recombinante e sequenciamento do respectivo inserto, foi possível verificar o fechamento do gap existente entre os dois “contigs”.

Com o intuito de alcançar o códon de parada, uma PCR utilizando o iniciador 3873\_3895 (Tabela 1) no sentido 5'-3' foi realizada. Após a análise da sequência, foi possível identificar o códon de terminação (TAA), e, finalmente, montou-se o último “contig” 42. No final, esse gene *cry* foi fechado com sobra, tanto no início como no final do gene, perfazendo um total de 4.458 nucleotídeos, dos quais, 3.516 bases compreendem a nova ORF.

Uma comparação com sequências depositadas no GenBank mostra que, o gene mais próximo, *cry032*, possui 22 nucleotídeos diferentes da ORF obtida a partir do isolado 113. Já quando a comparação é feita ao nível de proteína, são encontrados sete aminoácidos diferentes entre a ORF sequenciada e o gene *cry032*.

A partir de um alinhamento múltiplo (<http://align.genome.jp>) com as seis sequências mais similares à ORF sequenciada, foi gerado um dendrograma com base em sequências de aminoácidos (Figura 16). É possível verificar que a ORF obtida é similar a um grupo de quatro genes *cry* muito similares entre si, mas ela possui uma certa diferença entre eles. Dentre esses genes encontra-se o gene *cry032*, que é ativo contra nematoides, e três outros genes do grupo *cry1E*, efetivos contra lepidópteros (Figura 16).

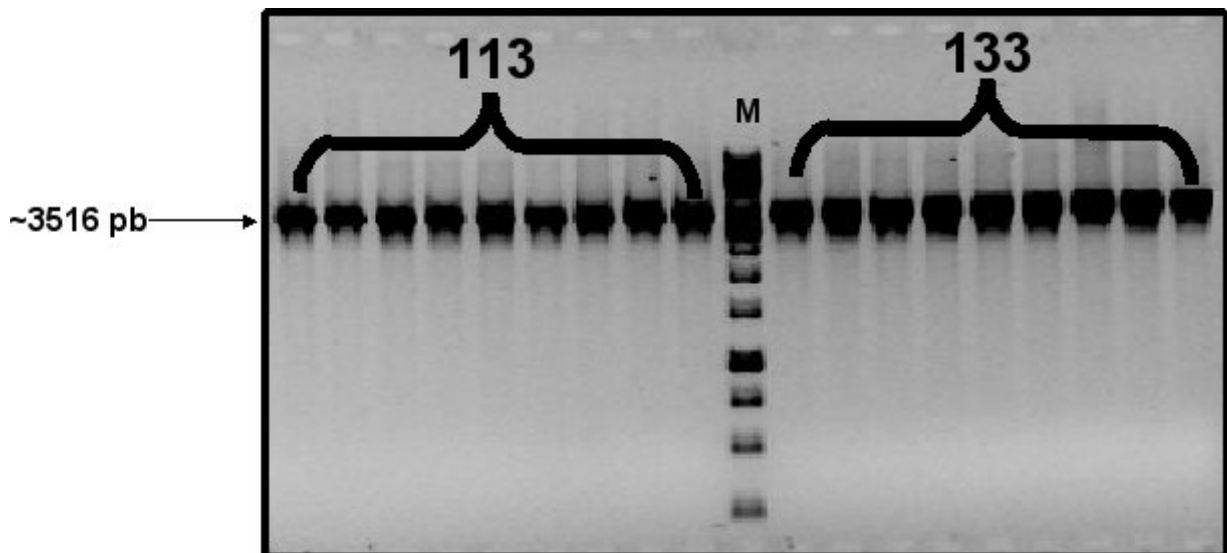


**Figura 16** Agrupamento de seqüências gênicas obtidas pelo alinhamento múltiplo executado pelo programa blast. A sequencia obtida nesse estudo é indicada como ORF.

## V.6. Amplificação, clonagem e expressão dos genes *cry*

### V.6.1. Clonagem e ressequenciamento dos genes

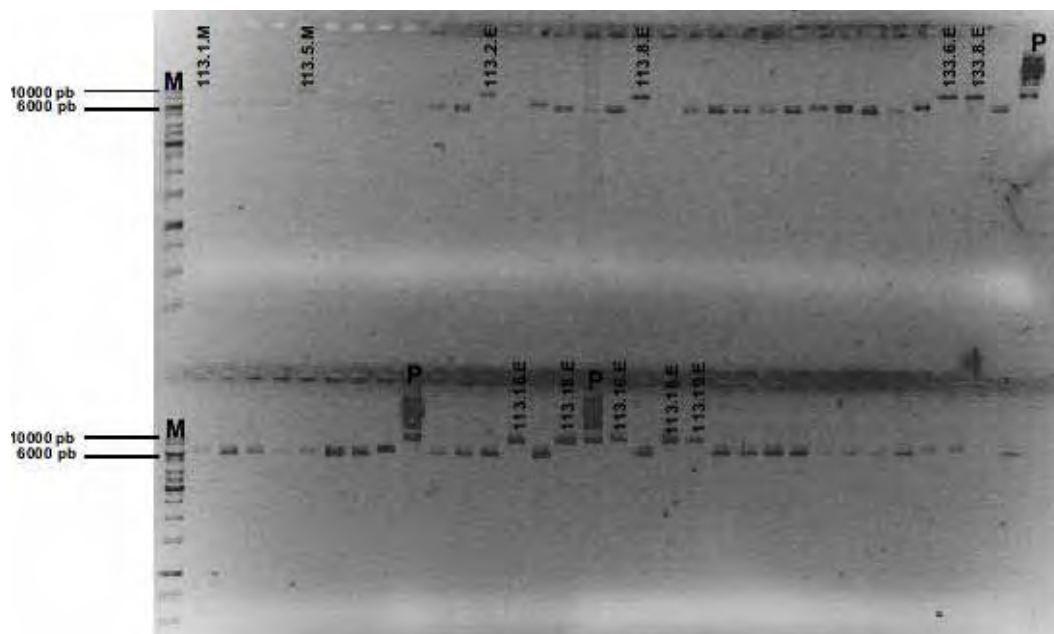
As ampliações dos dois genes (isolado 113 e 133) com vistas à clonagem não apresentou dificuldades. O par de oligonucleotídeos produzido para essa finalidade amplificou um fragmento único do tamanho esperado (3.516 pb) para os dois isolados (Figura 17).



**Figura 17** Amplificações dos dois genes (isolado 113 e 133) gerando um fragmento único do tamanho esperado (3.516 pb) para os dois isolados. M: 1kb DNA Ladder (Fermentas).

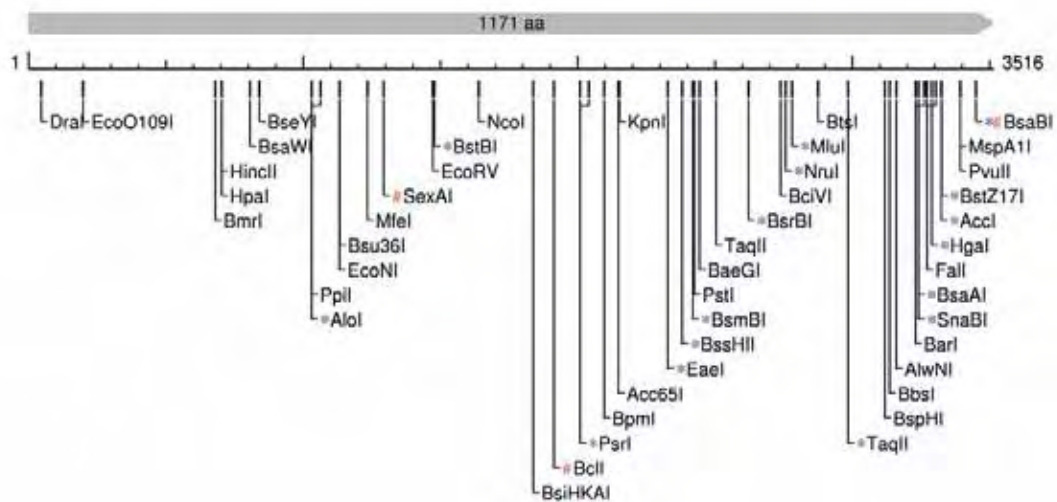
Após ligação no vetor pET SUMO esses dois fragmentos foram transformados em células quimicamente competente de *E. coli* One Shot Mach1-T1R, que acompanha o conjunto de reagentes obtido junto à Invitrogen (Champion™ pET SUMO Protein

Expression System). No entanto, obteve-se um baixo rendimento, uma vez que somente foi possível recuperar seis construções do isolado 113 e quatro do 133. Assim, nova transformação foi realizada em células quimicamente competentes de *E. coli* ER2566 (New England Biolabs, Inc.). Nesse segundo passo obtiveram-se 29 transformantes do isolado 113 e 27 do isolado 133. Essas construções foram multiplicadas em meio de cultura e procedido à extração plasmidial. A clivagem com a enzima NdeI, que lineariza o vetor, possibilitou verificar quais construções tinham o tamanho próximo ao esperado, que era de aproximadamente 9.000 pb (inserto + vetor). Verificaram-se que 9 construções tinham o tamanho esperado (Figura18).



**Figura 18.** Padrão de restrição dos fragmentos obtidos após clivagem dos DNAs plasmidiais com a enzima de restrição NdeI. P: Plasmídeos não clivado; M: 1kb DNA Ladder (Fermentas).

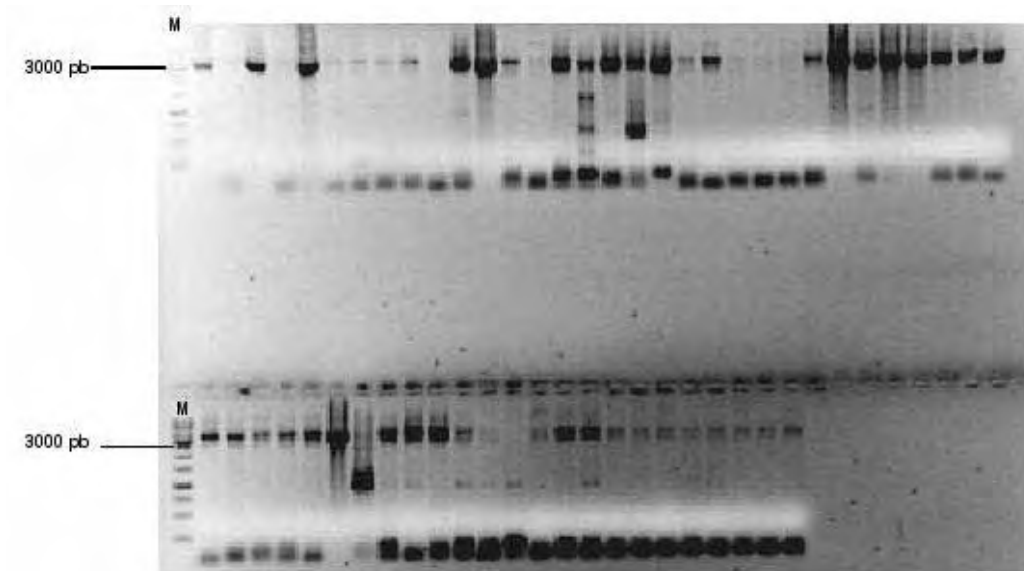
Concomitante às clivagens com a enzima NdeI, clivagens com as enzimas HindIII, EcoRI e EcoRV também foram realizadas em 17 construções escolhidas aleatoriamente (Tabela 2). Essas enzimas foram escolhidas após analisar o mapa de restrição para o primeiro gene sequenciado (Figura 19). Em nenhuma delas se observou o padrão de bandas esperado.



**Figura 19** Mapa de restrição gerado através da ORF de 3.516 pb obtida, indicando as enzimas que cortam o fragmento.

Em seguida, uma amplificação com os oligonucleotídeos SUMO forward e T7 reverse, que possuem sítio de pareamento no vetor de clonagem, mostrou que grande parte dos insertos tinham o tamanho esperado (Figura 20).

Após os resultados anteriores não terem sido conclusivos, buscou-se outra estratégia: combinar oligonucleotídeos iniciadores internos ao gene, utilizados para o sequenciamento, com oligonucleotídeos que pareiam somente no vetor. Dessa maneira, poderia determinar, além dos positivos para a inserção do gene, aqueles que estavam na orientação correta.

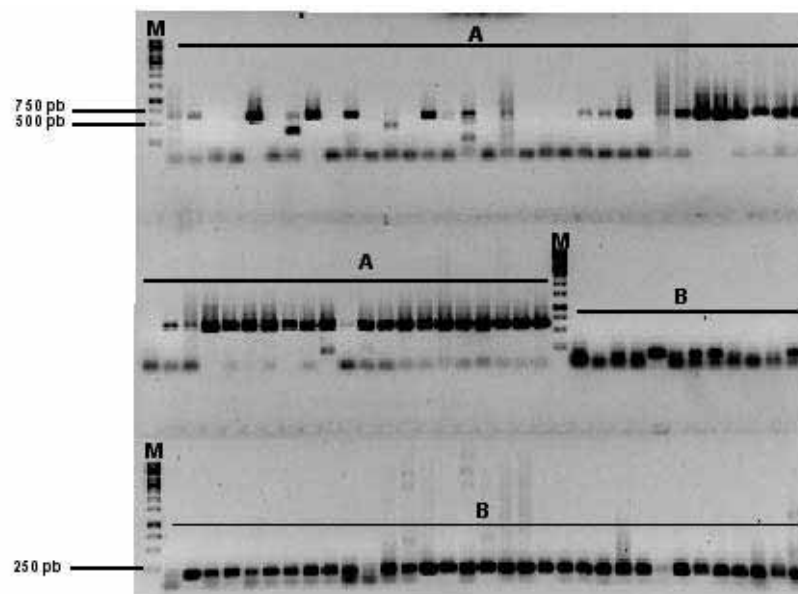


**Figura 20:** Amplificação de todas as construções obtidas com os oligonucleotídeos SUMO forward e T7 reverse. M: 1kb DNA Ladder (Fermentas).

Desse modo, o oligonucleotídeo iniciador SUMO F e o 920\_901 foram utilizados em todas as construções e gerou um fragmento de aproximadamente 600 pb (Figura 21). O tamanho esperado para esse par de iniciadores era de 640 pb. Juntamente, também foi realizada uma outra PCR com os iniciadores T7 Reverse e 3873\_3895. A banda esperada para esse par de oligonucleotídeos era de 178 pb. Devido a algum fragmento com tamanho muito próximo a esse presente fragmento esperado, em quase todas as amostras (Figura 21), essa combinação não foi satisfatória.

Persistindo, dúvidas sobre quais construções escolher para a expressão da proteína, mais quatro pares de oligonucleotídeos foram analisados: SUMO F e Right\_1038; T7 R e 3000\_3020; pETSUMO2\_F e away 5'; e pETSUMO2\_R e Left\_1276.

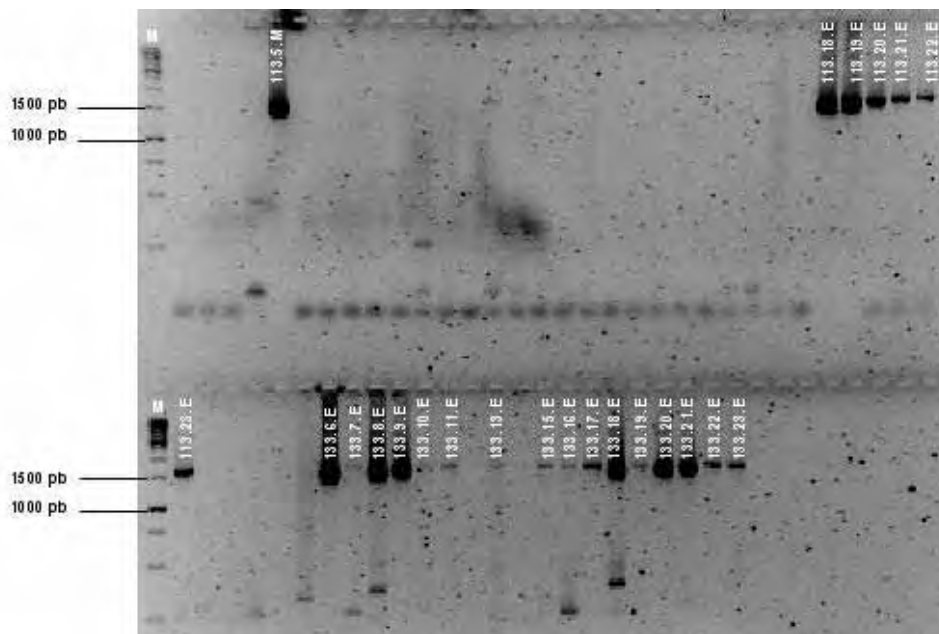
Os dois primeiros pares seriam para dirimir as dúvidas quanto à orientação correta, uma vez que somente haveria ampliações se as sequências estivessem corretamente orientadas. Após as análises, verificou-se que seis construções apresentaram amplificação corretamente para o primeiro par de iniciadores, enquanto que para o segundo par observou-se um maior número de positivos.



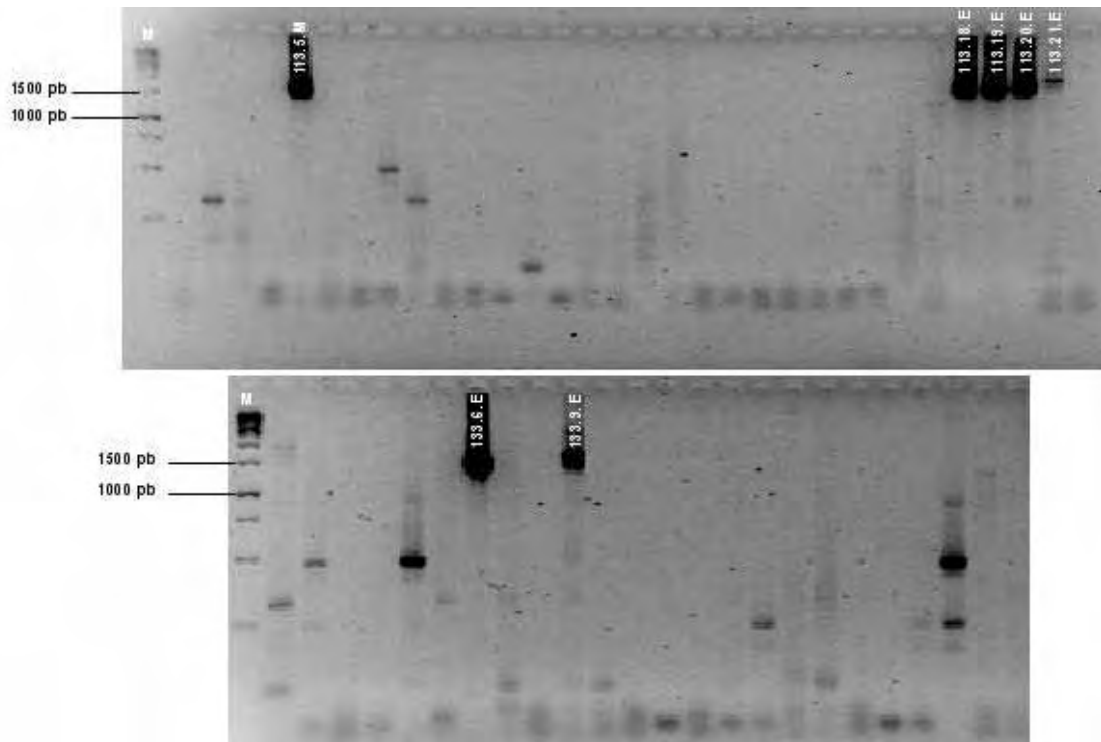
**Figura 21.** Análise eletroforética resultante de reações de PCR. Imagem “A”: resultados das ampliações com as combinações dos iniciadores SUMO F e o 920\_901. Imagem “B”: resultados das ampliações com as combinações com dos iniciadores T7 Reverse e 3873\_3895. M: 1kb DNA Ladder (Fermentas).

Finalmente, os dois últimos pares de oligonucleotídeos permitiram identificar as sequências que estivessem com algum tipo de deleção/inserção interna, haja vista que os dois iniciadores internos quase se sobrepõe, pois o away 5' inicia-se na posição 1.549 sentido reverso e o Left\_1276 inicia-se na posição 1.827 sentido direto, de modo

que eles abrangem 3.238 pb dos 3.516 totais dos genes. Os dois resultados apresentados pelo terceiro par indicou 23 positivos (Figura 22 ) e o quarto e último par indicou sete positivos (Figura 23).



**Figura 22.** Análise eletroforética resultante de reações de PCR. Resultados das ampliações com as combinações dos iniciadores pETSUMO2\_F e away 5'. M: 1kb DNA Ladder (Fermentas).



**Figura 23.** Análise eletroforética resultante de reações de PCR. Resultados das ampliações com as combinações dos iniciadores pETSUMO2\_R e Left\_1276. M: 1kb DNA Ladder (Fermentas).

A fim de poder visualizar os resultados e facilitar a seleção das construções que seriam submetidas ao ressequenciamento e aos testes de expressão, uma tabela sumarizando os dados foi construída (Tabela 2). Após as análises dos resultados, quatro construções foram selecionadas: 113.5.M, 113.18.E, 113.19.E e 133.6.E.

**Tabela 2.** Resumo dos testes realizados para selecionar as construções com a correta orientação das sequências a serem submetidas aos testes de expressão

Construção <sup>1</sup>	Clivagem com Enzimas				Amplificação por PCR (Pares de Oligonucleotídeos)					
	Nde I <sup>2</sup>	EcoR I <sup>3</sup>	EcoR V	Hind III	Sumo F x	T7 R x	Sumo F x	T7 R x	pETSUMO2_F x	pETSUMO2_R
					920_901 (640 pb)	3873_3895 (178 pb)	Right_1038 (1696 pb)	3000_3020 (1051 pb)	away 5' (1549 pb)	x Left_1276 (1689 pb)
113.1.M	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
113.2.M	-	NA	NA	NA	+	+	-	-	-	-
113.3.M	-	NA	NA	NA	-	+	-	-	-	-
113.4.M	-	NA	NA	NA	-	+	-	-	-	-
113.5.M	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
113.6.M	-	NA	NA	NA	-	+	-	-	-	-
133.1.M	-	NA	NA	NA	-	+	-	-	-	-
133.2.M	+	NA	NA	NA	+	+	-	-	-	-
133.3.M	+	NA	NA	NA	-	+	-	-	-	-
133.4.M	-	NA	NA	NA	-	+	-	-	-	-
113.1.E	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
113.2.E	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-
113.3.E	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
113.4.E	-	NA	NA	NA	+	+	-	-	-	-
113.5.E	-	NA	NA	NA	+	+	-	-	-	-
113.6.E	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
113.7.E	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-
113.8.E	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-
113.9.E	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-
113.10.E	-	NA	NA	NA	-	+	-	-	-	-
113.11.E	-	NA	NA	NA	-	+	-	-	-	-
113.12.E	-	NA	NA	NA	+	+	-	-	-	-
113.13.E	-	NA	NA	NA	+	+	-	-	-	-
113.14.E	-	NA	NA	NA	+	+	-	-	-	-
113.15.E	-	NA	NA	NA	-	+	-	-	-	-
113.16.E	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
113.17.E	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
113.18.E	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
113.19.E	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
113.20.E	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+
113.21.E	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+
113.22.E	-	NA	NA	NA	+	+	-	+	+	-
113.23.E	-	NA	NA	NA	+	+	-	+	+	-
133.1.E	-	NA	NA	NA	-	+	-	-	-	-
133.2.E	-	NA	NA	NA	-	+	-	-	-	-
133.3.E	-	NA	NA	NA	-	+	-	-	-	-
133.4.E	-	NA	NA	NA	+	+	-	-	-	-
133.5.E	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
133.6.E	+	NA	NA	NA	+	+	+	+	+	+
133.7.E	-	NA	NA	NA	+	+	-	+	+	-
133.8.E	-	NA	NA	NA	+	+	-	+	+	-
133.9.E	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+
133.10.E	-	NA	NA	NA	+	+	-	+	+	-
133.11.E	-	NA	NA	NA	+	+	-	+	+	-
133.12.E	-	NA	NA	NA	+	+	-	-	-	-
133.13.E	-	NA	NA	NA	+	+	-	+	+	-
133.14.E	-	NA	NA	NA	+	+	-	-	-	-
133.15.E	-	NA	NA	NA	+	+	-	+	+	-
133.16.E	-	NA	NA	NA	+	+	-	+	+	-
133.17.E	-	NA	NA	NA	+	+	-	+	+	-
133.18.E	-	NA	NA	NA	+	+	-	+	+	-
133.19.E	-	NA	NA	NA	+	+	-	+	+	-
133.20.E	-	NA	NA	NA	+	+	-	+	+	-
133.21.E	-	NA	NA	NA	+	+	-	+	+	-
133.22.E	-	NA	NA	NA	+	+	-	+	+	-
133.23.E	-	NA	NA	NA	+	+	-	+	+	-

<sup>1</sup> - M = Construções transformadas em One Shot Match 1<sup>-</sup> T1R (Invitrogen) e E = Construções transformadas em ER2566; <sup>2</sup> - - = Amostras que foram negativas para o teste realizado e + = Amostras que foram positivas para o teste realizado; <sup>3</sup> - NA = Amostras não submetidas ao teste

Com as quatro sequências confirmadas, passou-se a sequenciá-las para que se pudesse afirmar com certeza qual seria a constituição de bases de cada uma delas.

As reações iniciais não foram satisfatórias e houve necessidade de padronizar a quantidade de DNA nas reações, chegando ao valor de 1500 ng por reação como a concentração ótima. Ao todo, para as quatro construções, foram realizadas 676 reações de sequenciamento, sendo que ao final foi possível verificar que a construção 113.5.M, com 3.515 nucleotídeos, possui um nucleotídeo a menos na posição 17 (Houve a deleção de uma adenina). Esse fato inseriu um códon de parada na posição 16 da sequência de aminoácidos, inviabilizando a sua expressão. Considerando que o oligonucleotídeo 113\_Cloning\_pETSUMO2\_F tem 27 bases, essa deleção pode ter sido decorrente de um mau pareamento do iniciador. O resultado obtido para o 133.6.E, com 3.321 nucleotídeos, mostra que ele possui algumas diferenças na região 3' do gene, indicando ser diferente das outras construções. Já o 113.18.E e o 113.19.E são idênticos em termos de constituição de bases e estão corretamente inseridos no vetor. Portanto, tem-se dois genes sequenciados, sendo que as Figuras 24 e 25, apresentam as sequências de nucleotídeos, e Figuras 26 e 27, as sequências de aminoácidos.

Todas as construções são muito parecidas com os genes *cry032* (gi:17979619) e *cry1Ea* (gi:8469151), com e-value igual a 0 (zero), mas não são idênticas. Devido a essa similaridade, todas as comparações, das construções analisadas no presente texto, são relacionadas a esses dois genes, *cry032* e *cry1Ea*.

>113.19

```

atggagatagtgaataatcagaatcaatgctgcttataattgtttaaataatcctgaaaatgagatattagatattgaaaggccaatagtactgtag
caacaaacatcgcttggagatagtcgctgctcgcttccgcaactccaataggggggattttattaggattggttgatgcaaatatgggggtctatagg
cccttcacaatgggatttatttttagagcaaatgagctattgattgacccaaaaatagaggaattcgctagaaaccaggcaatttctagattagaaggg
ataagcagctctgtacggaatttatacagaagcttttagagagtggaagcagatcctactaatccagcattaaaagaagagatgctactcaatttaag
acatgaaacagtaattcttgaacagctattcctctttttcagttcaaaaattatcaagtccttattttagctatattgccaagctgcaaaattacattt
atcggttttgagagatggttcagtggttggcagggcttgggatttgatataagcaacaataaatagtcggttataatgatctgactagacttattcctata
tatacagattatgctgtacgctgttacaatcgggatttagatcgcttaccacgaactggggctgcaaaactgggcaagatttaacagtttagaagag
agttacaataatcagatttagatattattctttttcagaaaattacgattctagattatataccaattccaacaagctccaattaacgcgggaagtata
tacagatccggtaattataataactgactatagagttggcccagcttcgagaatattgagaactcagccattagaagccccacccttatggacttctta
aataatttgaccattgatacggatttgattagaggttctactattgggcagggcactcgtgtaacttctcattttacaggtagttctcaagtgataacaa
cccctcaataggataaccgcaaatgcggaaccaagcgaactattgctcctagtaactttccaggcttaacctattttatagaacattatcaaatcc
ttcttccgaagatcagaaaaattactcctaccttagggataaatgtagtacagggagtagggttcattcaacaaaataatgctgaagttctatataga
agtagggggacagtagattctcctaatgagttaccaattgtaggtgagaattcatagttggatagtagtcatcgattaagtcagttacactaaccagggt
cgttatataataactaataataactagcctgccaacattggttggacacatcacagtgctactaatacaatacaattaatccagatattattacacaaat
accttagtgaaggatttagacttggtggtggcacctctgtcattaaaggaccaggatttacaggaggggatccttcgaagaaaataccattggtgag
tttgtgctttacaagccaatataactcaccattaccaagataccggttaagattcgttatgctccagtagggatgacgaattactgtagcga
taggaggcaaaattagatagatagacccttgaaaaaccatggaattggggagagcttaacatctagaacatttagctataccaattttagtaacc
ttttcatttagggctaaccagatataatagaatagctgaagaactcctattcgtggtggtgagctttatagataaaatgaaacttattctagca
gatgcaacatttgaagaagaatgatattgaaagagcagagaagcggtagaatccctggttacttctacaaatcaactagggtcaaaaacagatgtga
cggattatcatattgatcaagtttccaatttagttgagtggttatcggatgaattttgtctggatgaaaagagagaattatccgagaagtcacaacatgc
gaagcagctcagtgatgaacggaatttacttcaagatccaaacttcagagggatcaataggcaaccagaccggtggtggagaggaagcacggatattact
atccaaggtggagatgacgtattcaagagaattacgtcacattaccgggtacctttgatgagtgctatccaacgtattttatatcaaaaaatagatgagt
cgaagttaaaagcttataccgctatgaattaaagaggtatcagggatagtagcaagacttagaaaatctatttaattcgtcaaatgcaaaacacagagac
agtaaacgtgccaggtacgggttccctatggccgctttcagcccaagtcacaatcggaaaagtggtggaacccaatcgatgctgcccacacctgaaatgg
aatcctaactagatgctcctgcagagacggggaaaaatgtgccatcattcccacatttctccttggacattgattggtgtagtactaaatg
aggacttaggtgatgggtgatattcaagatgaagacacaagatggctatgcaagactaggaatctagagtttctcgaagagaaaccactattagggga
agcactagctcgtgtgaaaagagcgggagaaaaatggagagacaaatgcgaaaaatggaaatgggaaacaaatattggtttataaagaggcaaaagaatct
gtagatgctttatttgaactctcaatagatagattacaagcggatcgaatatacgcgatgattcatgctgagataaaacgcttcatagcattcagag
aagcgtatctgocagagctgtctgtgattccgggtgtcaatgagcgtatttttgaagaattagaagggcgtattttcaactgacttctcctatatgatgc
gagaatgtcattaaaaatggcgatttcaataatggcttatcatgctggaacgtgaaagggcatgtagatgtagaagaacagaacaaccatcgttcggctc
cttgttgtccagaatgggaagcagaagtgccacaagaagttcgtgtttgtccgggtcgtggctatattcctcgtgttacagcgtacaagagggatag
gagagggctgtgtgacgattcatgagatcgaagacaatacagacgaactgaaattcagcaactgtgtagaagaggaagtataccaacaacacggtaac
gtgtaataattatactgcgactcaagaagaacatgagggtagctacactcccgtaatcgaggatagacgaagcctatgaaagcaattctctgtacat
gcgtcagctatgaagaaaaatcgtatacagatagacgaagagagaatccttgtgaatcctaacagaggataggggattacacaccactaccagctggct
atgtgacaaaagaattagatgacctcccagaaaaccgataaggtatggattgagatcgggagaaaacggaaggaacattcatcgtggacagcgtggaattact
tcttatggaggaataa

```

**Figura 24.** Sequência completa da ORF presente no isolado 113 composta por 3.516 nucleotídeos.

>133.6

```

atggagatagtgaataatcagaatcaatgctgcttataattgtttaaataatcctgaaaatgagatattagatattgaaaggccaatagtactgtag
caacaaacatcgcttggagattagtcgctgctcgctccgcaactccaatagggggattttattaggattggttgatgcaaatatgggggtctatagg
cccttcacaatgggatttatttttagagcaaatgagctattgattgacccaaaaatagaggaattcgctagaaaccaggcaatttctagattagaaggg
ataagcagctctgtacggaatttatacagaagcttttagagagtggaagcagatcctactaatccagcattaaaagaagagatgctactcaatttaag
acatgaaacagtaattcttgaacagctattcctctttttcagttcaaaaattatcaagtcocattttttagctatattgttcaagctgcaaaattacattt
atcggttttgagagatggttcagtggttggcagggcttggggatttgatagcaacaataaatagtcggttataatgatctgactagacttattcctata
tatacagattatgctgtacgctgtacaatacgggatttagatcgcttaccacgaactggggctgcgaaactgggcaagatttaacagtttagaagag
agttacaataatcagctattagatattattctttttcagaaaattacgattctagattatataccaattccaacaagctccaattaaacgcggaagtata
tacagatccggtaattataataactgactatagagttggcccagcttcgagaatattgagaactcagccattagaagccccacccttatggacttctta
aataattgaccattgatacggatttgattagaggttctactatgggcagggcactcgtgtaacttctcattttacaggtagttctcaagtgataacaa
cccctcaataggataaccgcaaatgcggaaccaagcgaactattgctcctagtaactttccaggtcttaacctattttatagaacattatcaaatcc
ttcttccgaagatcagaaaaattactcctaccttagggataaatgtagtacagggagtagggttcattcaacaaaataatgctgaagttctatataga
agtagggggacagtagattctcctaatgagttaccaattgtaggtgagaattcatagttggatagtagtcatcgattaagtcagttacactaaccaggt
cgttataataactaataataactagcctgccaacattggttggacacatcacagtgctactaatacaatacaattaatccagatattattacacaaat
accttagtgaaggatttagacttggtggtggcacctctgtcattaaaggaccaggatttacaggaggggatccttcgaagaaaataccattggtgag
tttgtgctttacaagccaatataactcaccattaccaagataccgtttaagattcgttatgctccagtagggatgcacgaattactgtagcga
taggaggcaaaattagagtagatagacccttgaaaaaacctggaattggggagagcttaacatctagaacatttagctataccaatttttagtaacc
ttttcatttagggctaaccagatataatagaatagctgaagaactcctattcgtggtggtgagctttatagataaaatgaaacttattctagca
gatcaacatttgaagaagaatgatgttgaaagagcagagaagcggatgaatgccctgttacttctacaaatcaactagggctaaaaacagatgtga
cggattatcatattgatcaagtttccaatttagttgagtggttatcggatgaatgttctggtgaaagagagaattatccgagaagtcacaacatgc
gaagcgactcagtgatgaacggaatttacttcaagatccaaacttcagagggatcaataggcaaccagaccgtggtggagaggaagcacggatattact
atccaaggtggagatgacgtattcaagagaattacgtcacattaccgggtacctttgatgagtgctatccaacgtattttatcaaaaaatagatgagt
cgaagttaaaagcttataccgctatgaattaaagaggtatcagggatagtagcaagacttagaaaatctatttaattcgctacaatgcaaaacacagggc
agtaaacgtgccaggtacgggttccctatggccgctttcagcccaagtcacattcggaaagtgtggagaaccgaatcgatgctgcccacaccttgaatgg
aatcctaactagatgctcctgcagagacggggaaaaatgtgccatcattcccacatttctccttggacattgatgtggatgtacagacttaaatg
aggacttaggtgatgggtgatattcaagatgaagacacaagatggctatgcaagactaggaatctagagtttctcgaagagaaccactataggggga
agcactagctcgtgtgaaaagagcgggagaaaaatggagagacaaatgcgaaaaatggaaatgggaaacaaatattggttataaaagaggcaaaagaatct
gtagatgctttattgtaaaactcctaataatgatagattacaagcggatcgaataatcgcgatgattcatgctgagataaaacgcttcatagcattcgag
aagcgtatctgocagagctgtctgtgatccgggtgtcaatgcggtatttttgaagaattagaagggcgtattttcaactgacttctcctatagatgc
gggaaatgctcattaaaaatggcgatttcaataatggcttatcatgctggaacgtgaaagggcatgtagatgtagaagaacagaacaaccatcgttcggtc
cttgttgtccagaatgggaagcagaaggtgtcaagaagttcgtgtttgtccgggtcgtggctatattcctcgtgttacaagcgtacaagaggggatag
gagagggctgtgtaacgattcatgagatcgaagacaatacagacgaactgaaattcagcaactgtgtagaagaggaagtataccaacaacacggtaac
gtgtaataattatactgcgactcaagaagaacatgagggtagctacactcccgtaatcagggatagtagcaagcctatgaaagcaattcttctgtacat
gcgtcagctcatgaagaaaa

```

**Figura 25.** Sequência completa da ORF presente no isolado 133 composta por 3.321 nucleotídeos.

MEIVNNQNCVYPYNCLNNPENEILDIERSNSTVATNIALEISRLLASATPIGGILLGLFDAIWGSIGPSQWDLFLEQIELLIIDQKIEEFARNQAISRLEG  
 ISSLYGIYTEAFREWEADPTNPALKEEMRTQFNDMNSILVTAIPLFSVQNYQVPFLSVYVQAANLHLSVLRDVSFVFGQAWGFDIATINSRYNDLRLIPI  
 YTDYAVRWYNTGLDRLPRTGGGLRNWARFNQFRRELTISVLDIISFFRNYDSRLYPIPTSSQLTREVYTDVINITDYRVGSPFENIENSAIRSPHLMDFL  
 NNLTIDTDLIRGVHYWAGHRVTSHTGSSQVITTPQYGITANAEPRTIAPSTFPGLNLFYRTLNSNPFRRSENITPTLGINVVQGVGFIQPNNAEVLRYR  
 SRGTVDLSNELPIDGENSLVGYSHRSLHVTLTRSLYNTNITSLPTFVWTHSATNTNTINPDIITQIPLVKGFRLGGGTSVIKGPFGTGGDILRRNTIGE  
 FVSLQVNNINSPIQRYRLFRFYASSRDARITVAIGGQIRVDMTLEKMEIGESLTSRTFSYTNFNSPFSFRANPDIIRIAEELPIRGGELYIDKIELILA  
 DATFEEEDLERAQKAVNALFTSTNQLGLKTDVTDYHIDQVSNLVECLSDEFCLDEKRELSEKVKHAKRLSDERNLLQDPNFRGINRQPDGRGWRGSTDIT  
 IQGGDDVFKENYVTLPGTFDECYPTLYQKIDESKLIKAYTRYELRGYIEDSQDLEIYLIRYNAKHETVNVPGTGSLLWPLSAQSPIKGCGEPNRCAPHLEW  
 NPNLDCSCRDEKCAHSHHFSLDIDVGCTDLNEDLGVWVIFKIKTQDGYARLGNLEFLEEKPLLGEALARVKRAEKKWRDKCEKLEWETNIVYKEAKES  
 VDALFVNSQYDRLQADTNIAAMIHAADKRVHSIREAYLPELSVIPGVNAAI FEELEGRIFTAFSLYDARNVIKNGDFNGLSCWNVKGHVDVEEQNNHRSV  
 LVVPEWEAEVVSQEVVRVCPGRGYILRVTAAYKEGYGEGCVAIHEIEDNTDELKFSNCEVEEVYPNNTVTCNNTATQEEHEGYTTSRNRGYDEAYESNSSVH  
 ASVYEEKSYTDRRENPCESNRGYDYTPLPAGYVTKELEYLPETDKVWIEIGETEGTIVDSVELLLMEE\*

**Figura 26.** Sequência de aminoácidos predita a partir da ORF presente no isolado 113 composta por 1.172 códons.

MEIVNNQNCVYPYNCLNNPENEILDIERSNSTVATNIALEISRLLASATPIGGILLGLFDAIWGSIGPSQWDLFLEQIELLIIDQKIEEFARNQAISRLEG  
 ISSLYGIYTEAFREWEADPTNPALKEEMRTQFNDMNSILVTAIPLFSVQNYQVPFLSVYVQAANLHLSVLRDVSFVFGQAWGFDIATINSRYNDLRLIPI  
 YTDYAVRWYNTGLDRLPRTGGGLRNWARFNQFRRELTISVLDIISFFRNYDSRLYPIPTSSQLTREVYTDVINITDYRVGSPFENIENSAIRSPHLMDFL  
 NNLTIDTDLIRGVHYWAGHRVTSHTGSSQVITTPQYGITANAEPRTIAPSTFPGLNLFYRTLNSNPFRRSENITPTLGINVVQGVGFIQPNNAEVLRYR  
 SRGTVDLSNELPIDGENSLVGYSHRSLHVTLTRSLYNTNITSLPTFVWTHSATNTNTINPDIITQIPLVKGFRLGGGTSVIKGPFGTGGDILRRNTIGE  
 FVSLQVNNINSPIQRYRLFRFYASSRDARITVAIGGQIRVDMTLEKMEIGESLTSRTFSYTNFNSPFSFRANPDIIRIAEELPIRGGELYIDKIELILA  
 DATFEEEDLERAQKAVNALFTSTNQLGLKTDVTDYHIDQVSNLVECLSDEFCLDEKRELSEKVKHAKRLSDERNLLQDPNFRGINRQPDGRGWRGSTDIT  
 IQGGDDVFKENYVTLPGTFDECYPTLYQKIDESKLIKAYTRYELRGYIEDSQDLEIYLIRYNAKHEAVNVPGTGSLLWPLSAQSPIKGCGEPNRCAPHLEW  
 NPNLDCSCRDEKCAHSHHFSLDIDVGCTDLNEDLGVWVIFKIKTQDGYARLGNLEFLEEKPLLGEALARVKRAEKKWRDKCEKLEWETNIVYKEAKES  
 VDALFVNSQYDRLQADTNIAAMIHAADKRVHSIREAYLPELSVIPGVNAAI FEELEGRIFTAFSLYDAGNVIKNGDFNGLSCWNVKGHVDVEEQNNHRSV  
 LVVPEWEAEVVSQEVVRVCPGRGYILRVTAAYKEGYGEGCVTIHEIEDNTDELKFSNCEVEEVYPNNTVTCNNTATQEEHEGYTTSRNRGYDEAYESNSSVH  
 ASVYEEK

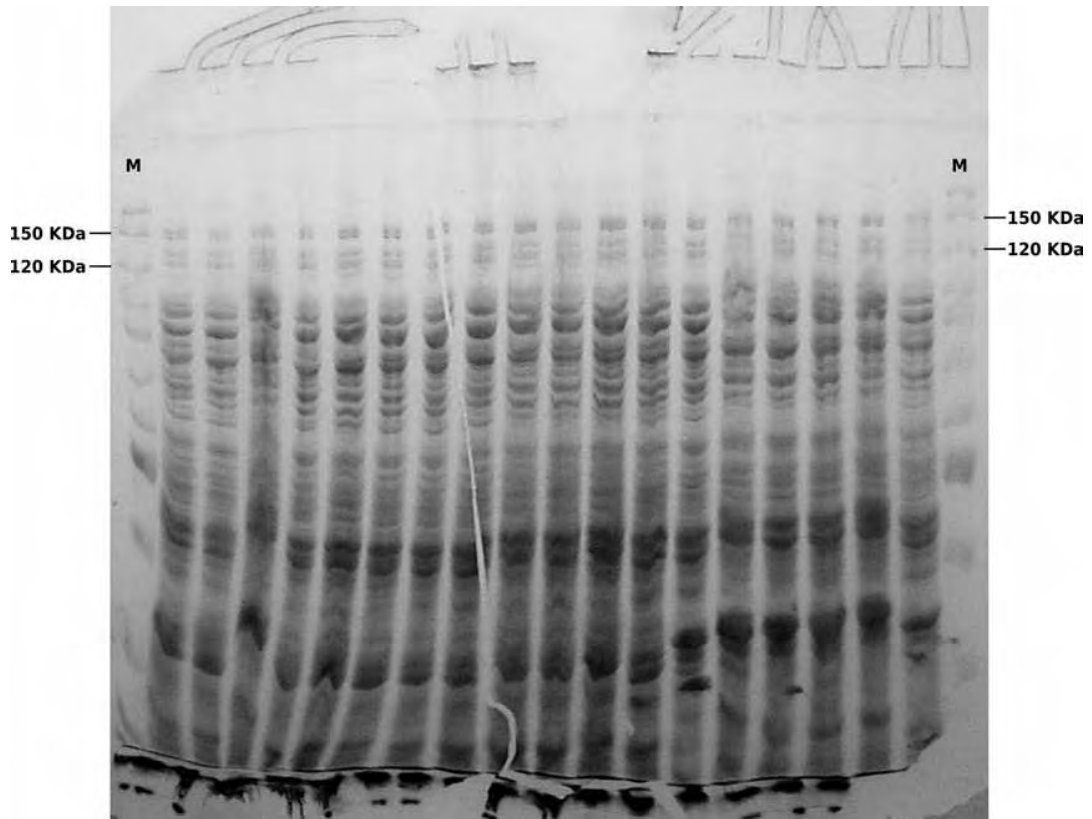
**Figura 27.** Sequência de aminoácidos predita a partir da ORF presente no isolado 133 composta por 1.107 códons.

Durante o andamento final do projeto foi verificado que alguns dos últimos ensaios e experimentos deveriam ser executados concomitantemente. Assim, o ressequenciamento dos genes, os testes de expressão e o bioensaio se deram quase que ao mesmo tempo. Por esse motivo, os primeiros testes de expressão foram realizados com as quatro construções, 113.5.M, 113.18.E, 113.19.E e 133.6.E, uma vez que não se tinha conhecimento da mudança na fase de leitura e, conseqüentemente, da presença do códon de parada prematuro.

As primeiras tentativas de se expressar as proteínas se deram de acordo com o sugerido pelo conjunto de reagentes utilizado para a clonagem, Champion pET SUMO Protein Expression System (Invitrogen), ou seja, meio de cultura LB, 4-6h de multiplicação após indução e 1,0 mM de IPTG a 37 °C. Após diversas tentativas, não foi possível obter as proteínas. A primeira providência foi transferir as quatro construções para células de *E. coli* BL21(DE), pois, devido à clonagem inicial dos produtos da ligação nas células de *E. coli* One Shot Mach1-T1R não ter produzido grande quantidade de transformantes, optara-se por clonar diretamente em células de *E. coli* ER2566, ou seja, aventou-se que a ausência de expressão se devia à célula hospedeira, linhagem ER2566. Infelizmente, as construções em BL21(DE) também não expressaram.

Devido a isso, passou-se a variar condições de multiplicação e quantidade do indutor IPTG. Foram testados 3 meios de cultura diferentes, 3 temperaturas de multiplicação distintas, 4 concentrações do indutor IPTG e 3 períodos de multiplicação (vide seção Material e Métodos para maiores detalhes).

Os primeiros resultados demonstraram que as proteínas analisadas não expressavam a 37 °C, aparecendo somente nas condições submetidas a 18 e 25 °C. Devido o tamanho das proteínas expressas, estimado em, aproximadamente, 134 KDa, a identificação das mesmas no gel era muito difícil, uma vez que elas eram expressas em pequenas concentrações, em relação às proteínas da célula hospedeira. Assim, na região do gel onde elas apareciam havia outras proteínas da célula hospedeira com massa parecida e, às vezes, com maior concentração (Figura 28), dificultando a visualização dos alvos.



**Figura 28.** Eletroforese de proteínas totais de dois isolados de *Bacillus thuringiensis*, isolados 113 e 133, em gel de poliacrilamida-dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE) 10% corado com Coomassie Brilliant Blue. M: marcador molecular (KDa) PageRuler Unstained Protein Ladder (SM0661, Lote 00028137, Fermentas) e as posições relativas a 120 e 150 KDa estão destacadas.

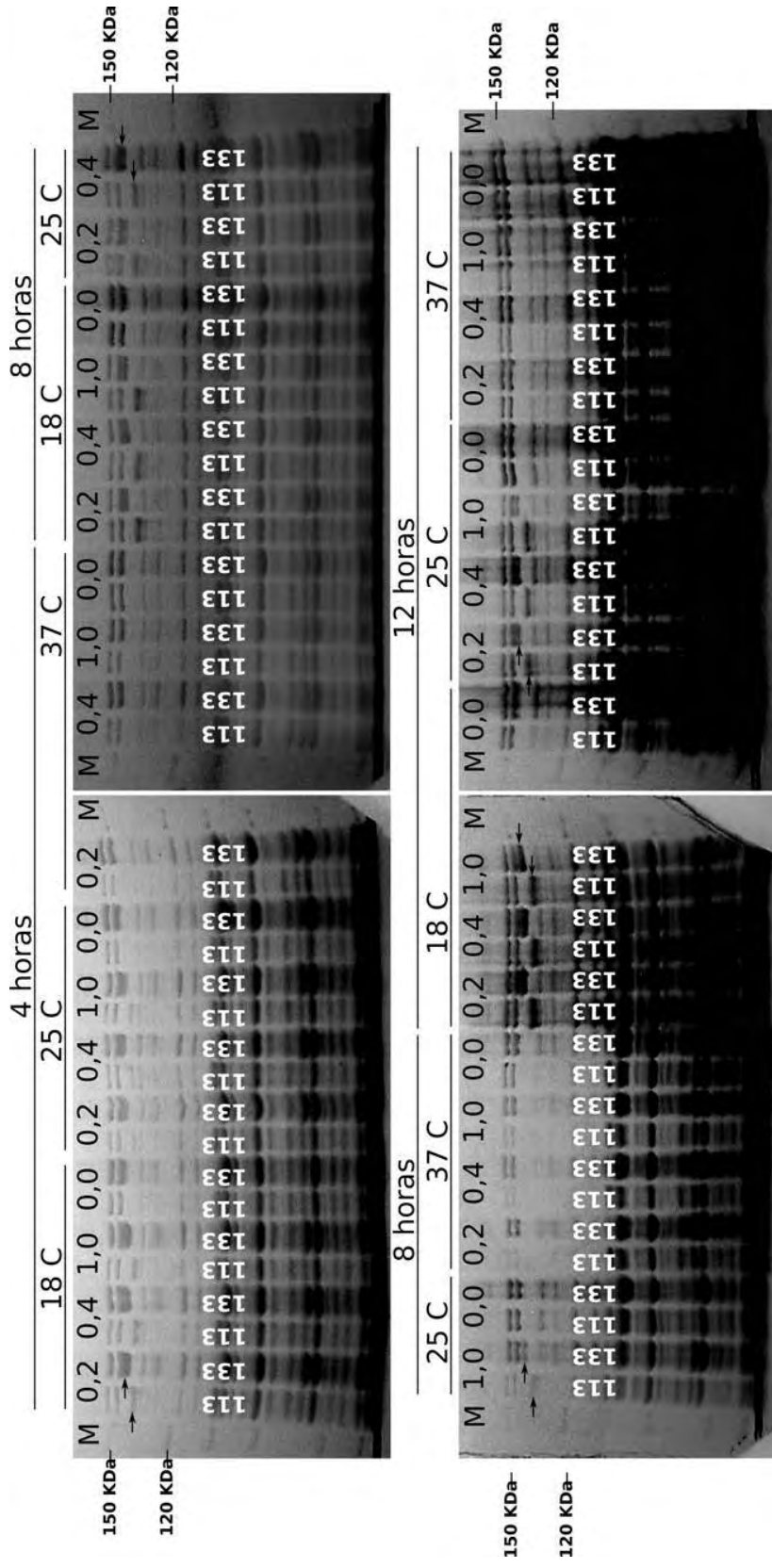
Buscou-se diminuir a concentração de poliacrilamida do gel e de separação. Após testar as concentrações de 12, 10, 8 e 6%, verificou-se que a última apresentava a melhor resolução. Além disso, verificou-se que géis com campo de separação menor que 15 cm não são adequados para esse caso, uma vez que as proteínas alvos

chegam ao final (base) do gel sem separar das proteínas da célula hospedeira. O ideal seriam géis igual ou superior a 20 cm para uma boa resolução.

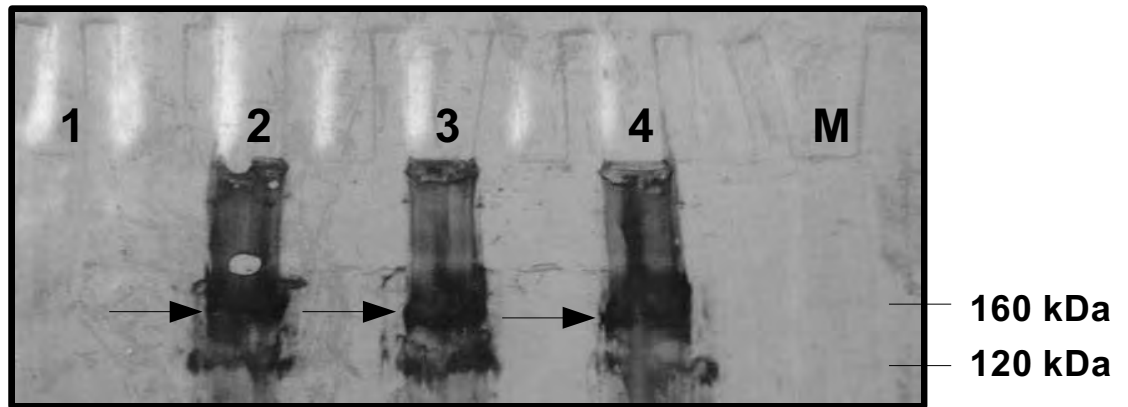
Os resultados em géis de poliacrilamida-dodecil-sulfato de sódio 6% mostraram que a expressão das proteínas é maior a 18 °C, se mantém detectável a 25 °C, mas em menor concentração que a 18 °C, e confirmaram que não são expressas a 37 °C, isso para todos os 3 tempos de indução testados. A partir de 4 h de multiplicação já é possível identificar as proteínas no gel, mas, numa baixa concentração, e a 12 h observou-se o máximo de expressão (Figura 29).

Um fato interessante foi observar que a proteína a partir do isolado 133 tem uma massa maior que a proteína a partir do isolado 113 (Figura 29).

Para a confirmação de expressão da proteína, inicialmente a partir da construção 133.6, as frações protéicas foram transferidas para membrana de nitrocelulose e o Western Blotting foi realizado na tentativa de detectar a proteína recombinante pela ligação do anticorpo anti-His à cauda de polihistidina da proteína. Na Figura 30, pode-se observar a banda correspondente à reação do anticorpo contra a proteína expressa dos controles positivos, ao passo que não houve nenhuma detecção com relação ao extrato preparado com células de *E.coli* com 0,0 mM de IPTG, mostrando a ausência da histidina e, portanto, a ausência de expressão.



**Figura 29.** Eletroforese de proteínas totais de dois isolados de *Bacillus thuringiensis*, isolados 113 e 133, em gel de poliacrilamida-dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE) 6% corado com Coomassie Brilliant Blue. 4 horas, 8 horas e 12 horas foram os tempos de multiplicação celular após a adição do indutor IPTG até a extração das proteínas totais. 18° C, 25° C e 37° C foram as temperaturas nas quais as amostras foram submetidas durante o tempo de multiplicação celular. 0,2, 0,4, 1,0 e 0,0 foram as concentrações, em mM, de IPTG adicionado em cada um dos pares de amostras. As barras horizontais indicam a abrangência do tratamento/condição de multiplicação celular. As flechas apontam para as bandas indicativas da proteína Cry produzida. M indica o marcador molecular (KDa) PageRuler Unstained Protein Ladder (SM0661, Lote 00028137, Fermentas) e as posições relativas a 120 e 150 KDa estão destacadas.



**Figura 30.** Visualização das bandas protéicas na membrana de nitrocelulose pelo Western-blotting com a construção plasmidial 133.6, induzidas com 0,2mM; 0,4mM; 1,0mM de IPTG, a 18°C. A membrana de nitrocelulose foi incubada com anticorpo monoclonal anti-His. As amostras correspondem a: 1 - controle não induzido a 0,0 mM; linhas 2 - amostra 133.6, induzida com 1mM de IPTG; 3 - amostra 133.6, induzida com 0,4 mM de IPTG; 4 - amostra 133.6, induzida com 0,2 mM. M: marcador de peso molecular de proteínas BenchMark™ Protein Ladder (Invitrogen).

### V.7. Bioensaio com nematoides

Foi desenvolvido um ensaio em placa de Petri para avaliar a eficiência de intoxicação e os efeitos da proteína Cry de *B. thuringiensis* na alimentação de nematoides.

Todos os tratamentos avaliados obtiveram diferenças significativas em relação à testemunha (Tabela 3). Observa-se que o número de nematoides ativos foi maior nos tratamentos testemunhas, onde o mesmo chegou a ter menos de 15% de mortalidade, mantendo-se estável no tratamento testemunha com água pura (Figura 31A), Além

disso, a grande maioria dos vermes que foram mantidos em suspensão aquosa ou em água com Tween (testemunhas) apresentaram desenvolvimento saudável.

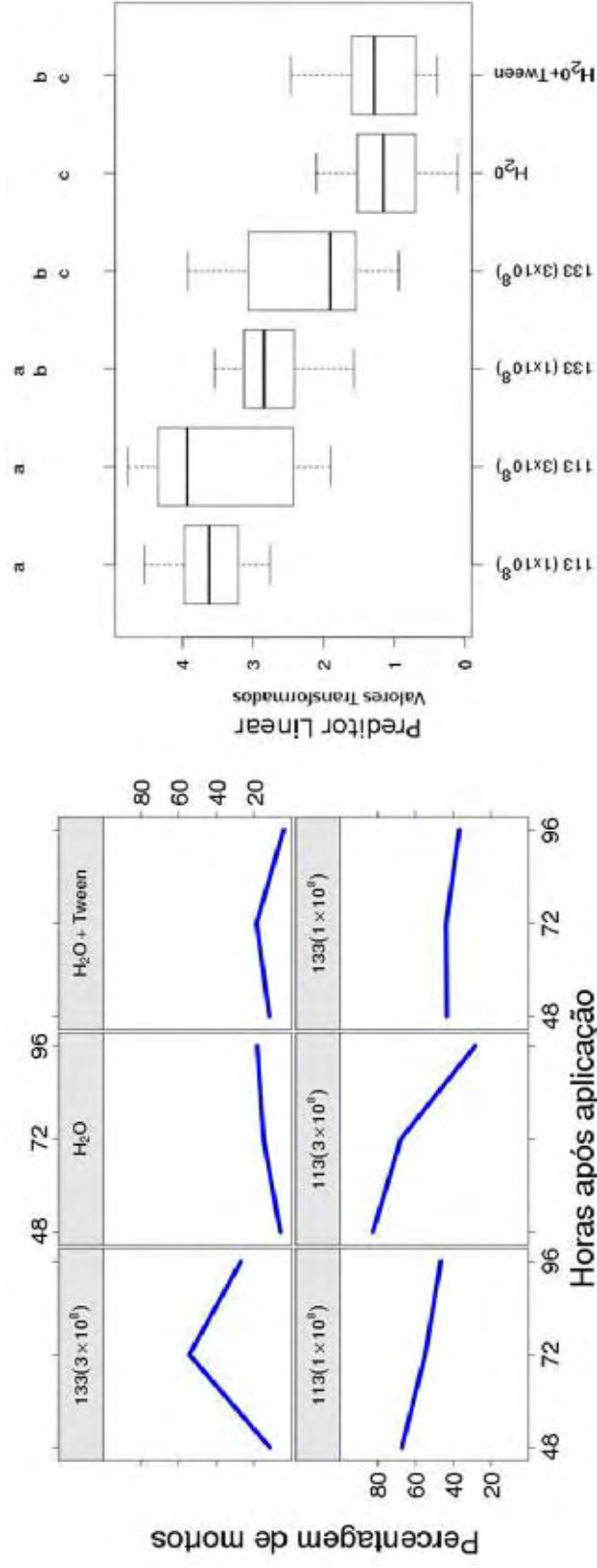
**Tabela 3.** Análise de Variância – ANOVA, utilizando delineamento inteiramente ao acaso com medidas repetidas, entre o percentual de nematoides mortos nos grupos controle e tratado, no período de 96 horas (numDF = graus de liberdade, F-value = valor de F calculado; p-value = nível de significância ajustado)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	296,42	<0,0001
tratamento	5	10,46	<0,0001
tempo	2	5,1	0,01
Tratamento:tempo	10	2,47	0,01

Por meio da análise de variância (Tabela 3) foi possível verificar a existência de diferenças significativas entre os isolados estudados. Nos tratamentos 113 e 133, o número médio de nematoides imóveis (mortos) foi maior que no tratamento testemunha. Todas as concentrações com os dois isolados utilizados no experimento (Figura 31 A, B) mostraram-se eficientes no controle de *Panagrellus* sp., o que demonstra a suscetibilidade deste verme ao *B. thuringiensis*. Na Figura 31A estão apresentados os dados observados da porcentagem de mortalidade dos nematoides e o tempo decorrido em função da ação de *B. thuringiensis*. A mortalidade foi maior nos intervalos de 48 e 72 h, e decrescendo a 96 h. Na avaliação realizada com 48h, a mortalidade foi maior no tratamento 113, que diferiu significativamente ( $P < 0,05$ ), dos demais tratamentos, exceto da testemunha (em ambas as concentrações), porém o 113 ( $3 \times 10^8$ ) se destacou com 80% de mortalidade, mas estatisticamente foi igual ao tratamento 113 ( $1 \times 10^8$ ) e 133 ( $1 \times 10^8$ ). O isolado 113 ( $3 \times 10^8$ ) pode ser, portanto, considerado o de melhor desempenho, pois destacou-se como o melhor isolado no controle dos nematoides para as concentrações testadas.

Uma comparação feita com o isolado 133 ( $1 \times 10^8$ ) em relação aos outros, foi observado que este teve o menor efeito controlador do verme (Figura 31A). No entanto, pode-se concluir que os tratamentos 113 e 133 mostraram-se eficientes para o controle, uma vez que o número médio de nematoides imóveis (mortos) encontrados nas avaliações foi superior aos encontrados nos tratamentos testemunha (Figura 31B). Embora, mesmo sendo pouco a diferença entre as concentrações testadas de esporos/mL, nota-se que todos os tratamentos  $3 \times 10^8$ , foram os mais eficientes.

Estes resultados estabelecem, pela primeira vez, em nosso grupo de pesquisa, que uma proteína Cry pode intoxicar e realizar controle biológico contra o nematoide (*Panagrellus* sp.). Embora os testes tenham sido realizados diretamente a partir dos isolados, os resultados ensejam perspectivas positivas de que no futuro, estes nematoides poderão ser capazes de ingerir as proteínas Cry aqui expressas. Assim sendo, a inserção destas proteínas em plantas transgênicas pode vir a controlar nematoides parasitas de planta.



**Figura 31.** Painel esquerdo: Porcentagem de mortalidade dos espécimes de nematoides *Panagrellus* sp. devido os diferentes tratamentos ao longo do tempo. Painel Direito: Gráfico do tipo “Box plot” evidenciando as diferenças estatísticas entre os diferentes tratamentos. Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si estatisticamente a 5% de probabilidade pelo método de Tukey.

## VI. DISCUSSÃO

Conhecer a sequência do DNA é uma fonte de pesquisa muito interessante para a descoberta de novos genes. Muitos estudos com o objetivo de isolar genes *cry* de *B. thuringiensis* têm sido realizados a fim de obter novos isolados como alternativa aos genes previamente já existentes e para os quais algum nível de resistência tenha aparecido nos insetos alvos.

Ao longo da última década, o grupo de pesquisa do Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada vem utilizando diversas estratégias moleculares visando identificar novos genes *cry* eficazes no controle de insetos-praga das mais diversas culturas de importância econômica. Várias linhagens de *B. thuringiensis* tem sido estudadas e testadas, entre elas destaca-se os isolados de *B. thuringiensis* 113 e 133. Esses isolados, após resultados preliminares, carregam genes *cry* com similaridade a genes *cry* eficazes no controle de nematoides e lepidópteros. Genes eficazes contra lepidópteros são comuns, mas, eficazes contra nematoides é fato raro, daí sua importância. Nesse sentido, experimentos adicionais foram conduzidos no sentido de buscar o conhecimento da sequência completa desses genes nesses isolados.

Inicialmente, a metodologia de Southern blotting, muito utilizada nos laboratórios de biologia molecular, foi utilizada para identificar um tamanho de fragmento de DNA com tamanho próximo a 4 ou 5 kb, o que é esperado para a grande maioria dos genes *cry*. Em um primeiro momento os resultados esperados não foram obtidos a contento. Segundo LARA (2002), nada adianta repetir a experiência nas mesmas condições anteriores, sem que sejam feitos testes de otimização, pois são vários os problemas encontrados nos manuais de Southern blotting, uma vez que, normalmente, estes

protocolos assumem que todas as sequências têm o mesmo perfil de hibridação, recomendando sempre as mesmas condições de força iônica, temperatura e tempo de hibridação. Geralmente, a reação não é conduzida sob condições ótimas e o resultado positivo, se obtido, poderia ser melhor. Conforme a sugestão do autor (LARA, 2002), neste estudo foram testadas seis enzimas de restrição a fim de poder estimar o tamanho dos respectivos genes e identificar um fragmento de DNA que facilitasse o sequenciamento completo da ORF em questão. A partir das mudanças realizadas, tais como a utilização de outro protocolo de extração de DNA genômico, foi possível obter uma sensível melhora nos filmes de raio-X, o que possibilitou iniciar o processo de construção da biblioteca genômica parcial.

Alguns estudos semelhantes para genes *cry* de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* linhagem BNS3 foram relatados por outros autores. TOUNSI & JAOUA (2003) utilizaram o DNA plasmidial da linhagem BNS3, clivaram com as enzimas de restrição HindIII e BamHI, e analisaram através da técnica de Southern blotting. Uma única banda correspondente ao tamanho esperado de 4 kb foi visualizada em um filme de raio-X. Deste modo, uma biblioteca do fragmento de 4 kb, gerado pela clivagem com as enzimas HindIII e BamHI, foi construída a partir do DNA plasmidial de BNS3 e o respectivo gene foi sequenciado e nomeado *crybns3-4*.

Segundo AMÉRICO (2009), uma grande dificuldade da clonagem de bibliotecas de DNA está no fato de se ter em mãos uma mistura complexa com sequências de DNA de diferentes tamanhos. Outra questão é que quanto menor o fragmento, mais eficientemente ele será clonado, dificultando a clonagem de fragmentos maiores que 1 kb, sendo necessário adicionar algumas etapas para remover os fragmentos de menor tamanho. Esse fato pode explicar a seleção de aproximadamente 60 clones recombinantes referentes ao isolado 113 por meio da técnica de hibridação de colônias e não se obter um grande incremento no sequenciamento do gene. A construção de biblioteca de DNA com clones de alta qualidade e uma quantidade suficiente para iniciar o sequenciamento completo do gene, deve ser realizada por meio de transformação, utilizando o método de eletroporação (AMÉRICO, 2009). Este autor utilizou a técnica de choque térmico com células competentes comerciais, especiais

para bibliotecas e para fragmentos grandes, e constatou que o controle, pUC18, funcionou bem, na ordem de  $10^9$  transformantes, mas não para as bibliotecas. O máximo de transformantes obtidos neste estudo foi na ordem de  $10^4$ . Com a eletroporação, conseguiu-se um aumento de duas ordens de grandeza  $10^6$ , sendo que não foi utilizada toda a reação de ligação.

A padronização das hibridações é outro ponto a se considerar, pois elas podem apresentar forte emissão de fundo (“background”). De fato, esse foi outro percalço a superar, o que foi obtido após vários testes. Alguns pesquisadores relataram que a eficiência da reação de marcação depende do tempo, da temperatura de incubação, do volume de reação final e da pureza dos ácidos nucleicos (HOLZ et al. 1997). Segundo LARA (2002), sinais de fundo (background) tendem a ser maiores, em métodos de hibridação não-radioativos, pois há ocorrência de interações inespecíficas das moléculas marcadas, necessitando um maior cuidado durante os procedimentos de bloqueio e de lavagens.

Estudos realizados por KONGSUWAN et al. (2005) buscando caracterizar um gene *cry* (*cry47Aa*) a partir da construção de uma biblioteca genômica, e com o DNA de interesse clivado com as enzimas de restrições EcoRV, PvuII e StuI, relataram que os clones obtidos foram amplificados por PCR, com oligonucleotídeos específicos previamente produzidos, e as bandas de interesse, após a clonagem em pGEM-T, foram submetidas ao sequenciamento. Isso possibilitou um caminhamento na sequência do gene e, a partir de então, combinações das várias sequências de PCR clonadas foram feitas, até conseguirem uma ORF completa do gene alvo. Os resultados mostrados por KONGSUWAN et al. (2005) são muito parecidos aos obtidos para o isolado 113, revelando uma estratégia similar para ampliar a sequência de nucleotídeos e o completo fechamento do gene.

Segundo HARDIN et al. (1996), a técnica do caminhamento cromossômico é uma estratégia de sequenciamento muito eficaz, pois quando um iniciador é sintetizado a partir de uma sequência conhecida, ele é utilizado para aumentar as informações a respeito de uma sequência de uma região previamente desconhecida. A partir de então uma nova informação será projetada para sintetizar um novo iniciador, e este processo

se torna contínuo até que a sequência de toda região seja determinada por completa. No entanto, essa técnica não foi tão trivial no presente estudo, pois os oligonucleotídeos iniciadores sintetizados, mesmo sendo utilizados individualmente, amplificaram diferentes partes do DNA. Esse fato pode ter acontecido em função de existirem outros genes *cry* nesse mesmo isolado, muito parecidos entre si, e de se ter usado iniciadores não purificados. Normalmente, uma amostra de oligonucleotídeo iniciador pode conter fragmentos de tamanhos menores, que, em certas condições não são prejudiciais, mas, sob alta especificidade, podem causar problemas. Para sanar essa dificuldade, a purificação a partir do gel de agarose e clonagem de fragmentos grandes foram necessárias. Essa necessidade de se construir sucessivas bibliotecas de clones, tornou-se um processo relativamente demorado e laborioso, mas exitoso. Desse modo, ao pensar em sequenciar um gene por completo, vários quesitos devem ser avaliados e mais de uma técnica deve ser previamente considerada.

Por fim, a ORF obtida inicialmente foi muito semelhante ao gene *cry032*, que é eficaz no controle de nematoides e também muito semelhante ao *cry1Ea*, eficaz no controle de lepidópteros. Esta descoberta revela um possível gene extremamente interessante. Além disso, genes *cry* efetivos contra nematoides são raros e considerando sua importância na agricultura, a identificação de um gene com essa característica torna-se fundamental, sendo objeto de pesquisa de vários grupos de estudos.

Apesar da sequência obtida inicialmente ser muito similar aos outros seis, o dendrograma obtido (Figura 16) a partir de alinhamento múltiplo das sequências mais similares a ela mostra que existem outros genes mais similares entre si que a sequência obtida neste estudo. WARD et al. (1988) mostraram que a substituição de um único aminoácido na proteína *cyt1Aa1* resultou em modificação da toxicidade em relação ao tipo selvagem.

Neste trabalho, duas abordagens diferentes foram adotadas. Na primeira optou-se pela identificação e caracterização de novos genes *cry*. E numa segunda etapa dois genes *cry* foram clonados em vetor de expressão e finalmente realizou-se bioensaio

contra nematoides de vida livre, a fim de determinar seu poder toxicológico e sua especificidade.

Em relação a expressão das proteínas Cry foram encontradas algumas dificuldades no presente estudo. Inicialmente o tamanho do gene foi um fator que demandou trabalhos excessivos, fato este que demonstrou a necessidade de esforços na busca pela expressão das proteínas de alto peso molecular. BANEYX & MUJACIC (2004), contornaram seus problemas relacionados a expressão usando diferentes concentrações do indutor e/ou do meio de cultura, e, também de temperaturas de indução. Estes dados estão de acordo com os resultados obtidos neste estudo, pois elevados níveis de expressão foram obtidos a temperatura de 18 °C, sendo possível identificar as proteínas a partir de 4h de multiplicação, observando o máximo de expressão a 12 h. Não foi observado indução a 37 °C como o sugerido no protocolo do vetor de expressão pET SUMO, indicando que muitas vezes não são satisfatórios para o sucesso do trabalho, necessitando outras abordagens.

A ausência da expressão é um outro fator que está relacionado com a composição nucleotídica na região codificadora inicial que parece ser importante para a expressão gênica, bem como a presença de códons raros, localizados ao final do gene, que podem causar alterações na fase de leitura (KANE, 1995; LAURSEN et al., 2005; BANDMANN & NYGREN, 2007). Outro ponto importante em relação a expressão de proteínas recombinantes em *E. Coli*, está relacionado quando códons do gene recombinante diferem de códons da célula hospedeira, pois o sucesso da técnica pode se tornar muito mais difícil. Diante destas informações, neste estudo examinou-se a seqüência das quatro construções para a presença desses códons raros, o que auxiliou na seleção daqueles que entraram em frame correto, obtendo a expressão dos dois genes estudados na bactéria.

As proteínas cry expressas no presente trabalho foram de aproximadamente 134 Kda, e, os resultados obtidos no sequenciamento revelaram que são ativas contra nematoides. De fato, estes dados estão de acordo com CRICKMORE et al., 2007 os quais revelaram que a maioria dos genes cry efetivos contra nematoides possuem proteínas de alto peso molecular. Por exemplo, as proteínas Cry5Aa e Cry5Ab foram

isoladas de *B. thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* e apresentam peso molecular de 152 e 142 kDa, respectivamente (CRICKMORE et al., 2007). Ambas as toxinas são ativas contra nematoides e ácaros (MONNERAT & BRAVO, 2000). Já a Cry12Aa que também é uma toxina com atividade dupla contra nematoídes e ácaros (MONNERAT & BRAVO, 2000) com peso molecular de 142 kDa, e, a proteína Cry21Aa possui massa molecular de 132 kDa e também é eficaz contra nematoides.

Em relação a eficácia dos isolados 113 e 133 em nematoides, testes de toxicidade contra nematoides de vida livre foram realizados. Os resultados indicaram que todos os isolados testados foram capazes de controlar estes vermes, que os mesmos prejudicaram significativamente, ocasionando a morte e muitas vezes afetando sua atividade. Sendo que o isolado 113 se destacou como o mais eficiente.

Estes resultados denotam a importância da realização de testes de eficácia por toxicidade, pois permitem a identificação de isolados eficientes contra a praga alvo. Como os nematoides aqui testados responderam a algumas ações das proteínas Cry, sugere-se que estes vermes devem possuir enzimas proteolíticas nos receptores da membrana do seu meio intestinal necessárias para a ação das proteínas cristal. Esta abordagem está de acordo com ATKINSON e colaboradores (2003); estes autores afirmaram que a estratégia de controle de nematoides mais promissora está baseada no bloqueio ou redução do processo digestivo após a formação de poros no intestino do verme. Assim, foi possível verificar que os nematoides de vida livre demonstraram serem suscetíveis as proteínas Cry de *B. thuringiensis*.

A toxicidade foi demonstrada através da intoxicação, capacidade em se desenvolver, portanto, os genes identificados carregam características altamente promissoras no controle destes vermes. Neste sentido, uma avaliação mais eficaz poderá ser feita ao utilizar diretamente as proteínas expressas em *E.coli* neste estudo contra nematoides fitoparasitas.

É sabido que a *E. coli* tem sido utilizada com sucesso em muitos estudos para a produção ativa de proteínas inseticidas. A resposta a este estudo indicará a que certamente o *B. thuringiensis* estará agindo no intestino destes vermes. Resultados de bioensaio contra nematoides foram observados por WEI et al. (2003) em que duas

famílias de proteínas Cry: Cry5A e Cry12A, e um membro da família Cry6, Cry6B, quando expressas em *E. Coli*, não foram tóxicos para os nematoides estudados naquele ensaio, porém os resultados negativos também deverão ser considerados com muito cuidado porque, estas proteínas Cry podem ser ativas contra outros nematoides, ou elas podem ter ação nematicida em doses mais elevadas.

Segundo SCHNEPF et al. 2003, várias proteínas Cry tem sido descritas como nematicidas, e ainda WEI et al. 2003 testaram o efeito de *B. thuringiensis* contra os nematoides de vida livre demonstrando alta atividade nematicida dos genes *cry5B*, *cry6A*, *cry14A* e *cry21A* (WEI et al. 2003). Além disso, estima-se que aproximadamente 100.000 espécies de nematoides (ANDRASSY, 1992), muitas das quais vivem no solo podem ingerir bactérias. Em apoio a esta hipótese, alguns autores caracterizavam os efeitos tóxicos na via metabólica da proteína Cry5B de *B. thuringiensis* no nematoide *Caenorhabditis elegans* e também demonstraram que duas proteínas cristal, Cry6A e Cry14A, ocasionaram deformações no crescimento destes nematoides (GRIFFITTS et al., 2001; MARROQUIN et al., 2000).

Uma outra abordagem que deve ser lembrada seria em relação aos ICPs, que são altamente suscetíveis a vários fatores, como a luz ultravioleta, calor, e os ciclos de umidade. A expressão de genes *cry* em organismos que compõem as toxinas mais estáveis no meio ambiente foi proposto como uma maneira de superar esse problema. A *E. coli* é um sistema eficaz de expressão de genes *cry*, pois os parâmetros dos processos da biossintética são melhor compreendidos nesta bactéria. O uso de *E. coli* como um hospedeiro de expressão permite a produção seletiva de proteínas Cry com especificidade de bioinseticidas. Além disso, ela também pode ser usada como um veículo eficaz para a produção industrial de proteínas cristal, funcionalmente melhorada pela genética e engenharia de proteínas (BUKHARI & SHAKOORI, 2009). Alguns autores estabeleceram condições adequadas para uma larga expressão em *E. coli* do gene *cry1Ac73* e *cry1Ac* (GE et al., 1991, ARONSON., 1995).

Sendo assim, os dados obtidos neste estudo poderá contribuir para a construção de plantas geneticamente modificadas, expressando proteínas Cry eficazes no controle de nematoides, fato altamente positivo e almejado, diminuindo assim os gastos muitas

vezes ineficientes com inseticidas químicos e conseqüentemente contribuindo com uma melhor qualidade do meio ambiente.

Assim, nesse estudo, foi possível conhecer a seqüência completa de nucleotídeo de uma ORF do isolado 113, e da seqüência parcial do isolado 133, fato este que ensejam expectativas que estes possíveis genes poderão ser úteis no desenvolvimento de inseticidas microbianos para o controle tanto de nematoides como de lepidópteros.

## VII. CONCLUSÕES

Diante da análise de todos os resultados aqui apresentados, pode-se concluir que:

1. Foram caracterizados dois novos genes *cry* pertencentes aos isolados 113 e 133;
2. O sequenciamento revelou dois novos genes *cry*, um com 3.516 nucleotídeos do isolado 113 e outro com 3.321 nucleotídeo do isolado 133;
3. Os novos genes *cry* clonados foram expressos em *E. coli*, e, o perfil eletroforético mostrou que os dois isolados (113 e 133) não são iguais;
4. Os resultados das proteínas expressas indicam que o isolado 133 possui uma sequência nucleotídica maior com que a do isolado 113;
5. Os isolados de *B. thuringiensis* foram potencialmente ativos contra os nematoides;
6. O bioensaio revelou que os nematoides de vida livre avaliados foram suscetíveis as proteínas Cry de *B. thuringiensis* pertencentes aos isolados 113 e 133.

## VIII. REFERÊNCIAS

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, USA, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.

ALVES, S. B.; ALMEIDA, J. E. M. Desenvolvimento, potencial de uso e comercialização de produtos microbianos. In: Alves, S. B. (org.) **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba: FEALQ. ed 2ª, p.1163, 1998.

AMÉRICO, J. A. Clonagem III: e as bibliotecas? 2009. Disponível em :<<http://rnasefree.blogspot.com/2009/04/clonagem-iii-e-as-bibliotecas.html>>. Acesso em: 16 de junho de 2009.

ANDRASSY, I. **Fundam. Appl. Nematol**, v. 15, p.187–188, 1992.

ARANTES, O. M. N.; VILAS-BOÂS, L. A.; VILAS-BÔAS, G. F. L. T. *Bacillus thuringiensis*: Estratégia no controle biológico. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. (Org.). **Biotecnologia: avanços na agricultura e agroindústria**. Caxias do Sul: EDUSC, p. 269-293, 2002.

ARCAS, J. A. Produccion de bacterias entomopatogenas. In: LECUONA, R. E. (Ed.). *Microorganismos patógenos empleados em el control microbiano de insectos plaga*. Argentina, p. 337, 1996.

ARONSON, A. I. The protoxin composition of *Bacillus thuringiensis* insecticidal inclusion affects solubility and toxicity. **Appl Environ Microbiol**, v. 61, p.4057–4060, 1995

ATKINSON, H. J.; URWIN, P. E.; MCPHERSON, M. J. Engineering plants for nematode resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 41, p. 615 -639, 2003.

BANDEIRA, C. M. **Seletividade de inseticidas a *Euborellia annulipes* (Lucas) (Dermaptera: Anisolabidae)**. 2009. 62 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2009.

BANDMANN, N.; NYGREN, P. A. Combinatorial expression vector engineering for tuning of recombinant protein production in *Escherichia coli*. **Nucleic Acids Res.**, Oxford, v. 35, n. 5, 2007.

BANEYX, F.; MUJACIC, M. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. **Nat. Biotechnol.**, Nova York, v. 22, n.11, p. 1399 - 1408, 2004.

BERÓN, C. M.; SALERNO, G. L. Cloning and Characterization of a Novel Crystal Protein from a native *Bacillus thuringiensis* isolate highly active against *Aedes aegypti*. **Current Microbiology**, v. 54, p. 271 - 276, 2007.

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

BIRD, D. M.; KALOSHIAN, I. Are roots special? Nematodes have their say. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 62, n.2, p. 115 - 123, 2003.

BRADFISH, G. A.; HICKLE, L. A.; FLORES, R.; SCHWAB, G. Nematocidal *Bacillus thuringiensis* toxins: opportunities in animal health and plant protection. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON *BACILLUS THURINGIENSIS*, 1., 1991, **Oxford Abstracts**.

BRAVO, A.; SARABIA, S.; LOPEZ, L.; ONTIVEROS, H.; ABARCA, C.; ORTIZ, A.; ORTIZ, M.; LINA, L.; VILLA-LOBOS, F. J.; GUADALUPE, P.; NUNEZ-VALDEZ, M. E.; SOBERÓN, M.; QUINTERO, R. Characterization of *cry* genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 4965 - 4972, 1998.

\_\_\_\_\_ N-terminal activation is an essential early step in the mechanism of action of the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac insecticidal toxin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 23985 - 23987, 2002.

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

BRODIE, B. B. Differential vertical movement of non volatile nematicides in soil. **Journal of Nematology**, v. 3, n. 3, p. 292 - 295, 1971.

BROWN, C. R.; MOJTAHEDI, H.; SANTO, G. S. Resistance to Columbia root-knot nematode in *Solanum* ssp. and in hybrids of *S. hougasii* with tetraploid cultivated potato. **American journal Potato**, v.68: 445 - 452, 1991.

- BOBROWSKI, V. L.; FIÚZA, L. M.; PASQUALI, G.; ZANETTINI, M. H. B. Genes de *Bacillus thuringiensis*: uma estratégia para conferir resistência a insetos em plantas. **Cienc. Rural**, v. 34, 843-850, 2003.
- BOONSERM, P.; DAVIS, P.; ELLAR, D. J.; LI, J. Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications. **Journal of molecular biology**, London, v. 348, n. 2, p. 363 - 382, 2005.
- BOONSERM, P.; M. O, M.; ANGSUTHANASOMBAT, C. H.; LESCAR, J. Structural of the functional form of the mosquito larvicidal Cry4Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.8 - Angstrom resolution. **J. Bacteriol.**, v.188, p. 3391 - 3401, 2006.
- BUKHARI, D. A. A.; SHAKOORI, A. R. Cloning and expression of *Bacillus thuringiensis* cry11 crystal protein gene in *Escherichia coli*. **Mol. Biol. Rep.**, v. 36, p.1661 - 1670, 2009.
- BULLA, L. A.; JR, BECHTEL, D. B.; KRAMER, K. J.; SHETHNA, Y. I.; ARONSON, A. I.; FITZ-JAMES, P. C. Ultrastructure, physiology and biochemistry of *Bacillus thuringiensis*. **Crit. Rev. Microbiol.**, v. 8, p. 147 - 204, 1980.
- CAPALBO, D. M. F. ; VILAS-BOAS, G. F. L. T.; ARANTES, O. M. N. ; SUZUKI, M. *Bacillus thuringiensis*: formulações e plantas transgênicas. **Biotecnologia ciência & desenvolvimento**, Brasília/DF, v. 34, p. 76 - 83, 2005.
- CAPPELLO, M.; BUNGIRO, R. D.; HARRISON, L. M.; BISCHOF, L. J.; GRIFFITTS, J. S.; BARROWS, B. D.; AROIAN, R. V. A purified *Bacillus thuringiensis* crystal protein with therapeutic activity against the hookworm parasite *Ancylostoma ceylanicum*. **PNAS**, v. 103, n. 103, p. 15154–15159, 2006.
- CHAK, K.F., et al. Expression of the crystal protein gene under the control of the  $\alpha$ -amylase promoter in *Bacillus thuringiensis* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 7, p. 2304-2310, 1994.
- CORDEIRO, Z. J. M. Doenças e métodos de controle. (Embrapa Mandioca e Fruticultura Sistema de Produção, 10). Acesso em: 20 de Janeiro de 2003.
- CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D. R.; FEITELSON, J.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; DEAN, D. H. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 62, p. 807 - 813, 1998.
- CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D. R.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; BRAVO, A.; DEAN, D. H. 7. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. Disponível em: < [http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil\\_Crickmore/Bt/](http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/) Acesso em: 2007.

CRICKMORE, N. *Bacillus thuringiensis*: toxin nomenclature. Disponível em: < [http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil\\_Crickmore/Bt/](http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/) >. Acesso em: 2008.

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

DE MAAGD, R. A.; BRAVO, A.; BERRY, C.; CRICKMORE, N.; SCHNEPF, H. E. Structure, diversity, and evolution of protein toxins from sporeforming entomopathogenic bacteria. **Annu. Rev. Genet.**, v. 37, p. 409 - 433, 2003.

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

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

FAN, S. H.; HO, K. K. A preliminary study on the life history, rearing method of *Apanteles plutellae* Kurd. and the effects of different insecticides to it. **Plant Prot. Bull.**, v. 13, p. 156 - 161, 1971.

FAO FOOD AGRICULTURAL ORGANIZATION, 2009. Disponível em: [www.fao.org](http://www.fao.org). Acesso em: 19 de junho de 2009.

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

FEITELSON, J. S.; PAYNE, J.; KIM, L. *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. **Bio/Technology**, v. 10, p. 271 - 275, 1992.

FIUZA, L. M.; LEROUX, C. N.; GOZE', E.; FRUTOS, R.; CHARLES, J. F. Binding of *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxins to the midgut brush border membrane vesicles of *Chilo suppressalis* (Lepidoptera:Pyralidae): Evidence of shared binding sites. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 5, p. 1544 - 1549, 1996.

FREITAS, L. G.; NEVES, W. D.; MARRA, B. M.; ALMEIDA, A. M. S.; ROMEIRO, R. S. Isolamento e seleção de rizobactérias para o controle do nematóide das galhas (*Meloidogyne* spp.) na cultura do tomateiro. **Nematologia Brasileira**, 2001.

GALITSKY, N.; CODY, V.; WOJTEZAK, A.; GHOSH, D.; LUFT, J. R.; PANGBORN, W.; ENGLISH, L. Structure of the insecticidal bacterial  $\delta$ -endotoxin Cry3Bb1 of *Bacillus thuringiensis*. **Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.**, v.57, p.1101 - 1109, 2001.

GE, A. Z.; RIVERS, D.; MILINE, R.; DEAN, D. H. Functional domains of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins. **J. Biol. Chem.**, v. 266, n. 27, p.17954 - 17958, 1991.

GLARE, T. R.; O'CALLAGHAM, M. *Bacillus thuringiensis*: biology, ecology and safety. **Chichester**, p. 350, 2000.

GONÇALVES, J. F.; LAIA, M. L.; CORDEIRO, J. X. ; LEMOS, M. V. F. Identification of new *cry* genes in *Bacillus thuringiensis* isolates by multiplex PCR and RFLP. **Research Journal of Agriculture and Biological Sciences**, v. 5, p. 326 - 337, 2009.

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

GOULD, F.; BLAIR, N.; REID, M.; RENNIE, T.L.; LOPEZ, J.; MICINSKI, S. *Bacillus thuringiensis*-toxin resistance management: Stable isotope assessment of alternate host use by *Helicoverpa zea*. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, USA, v. 99, p. 16581 - 16586, 2002.

GRIFFITTS, J. S.; WHITACRE, J. L.; STEVENS, D. E.; AROIAN, R. V. Bt toxin resistance from loss of a putative carbohydrate-modifying enzyme. **Science**, v. 293, p.860–864, 2001.

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

GROCHULSKI, P.; MASSON, L.; BORISOVA, S.; CAREY, M. P.; SCHWARTZ, J.; BROUSSEAU, R.; CYGLER, M. *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) Insecticidal Toxin: Crystal Structure and Channel Formation. **J. Mol. Biol.**, v. 254, p. 447 - 464, 1995.

GUAZELLI, M. J. Agrotóxicos. Remédio ou veneno? Uma discussão. Brasil. O maior consumidor de agrotóxicos agrícolas, 296, Ano IX, 2009, ISSN 1981-8469.

HABIB, M. E. M.; ANDRADE, C. F. S. Bactérias Entomopatogênicas. In: Alves, S. B. (org.). **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba. FEALQ, 1998.

HARCOURT, R. L.; KYOZUKA, J.; FLOYD, R. B.; BATEMAN, K. S.; TANAKA, H.; DECROOCQ, V.; LLEWELLYN, D. J.; ZHU, X.; PEACOCK, W. J.; DENNIS, E. S. Insect- and herbicide-resistant transgenic eucalypts. **Mol. Breed.**, v. 6, p. 307 - 315, 2000.

HARDIN, S. H.; JONES, L. B.; HOMAYOUNI, R.; MCCOLLUM, J. L. Octamer-primed cycle sequencing: design of an optimized primer library. **Genome Res.** v. 6, n.6, p. 545 - 550, 1996.

HERRERA-ESTRELLA, L. Transgenic plants for tropical regions: Some considerations about their development and their transfer to the small farmer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 11, p. 5978 - 5981, 1999.

HOLZ, H. A new member of labeling reagents, optimized for a variety of nucleic acids, independent of size or conformation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 3, p. 26 - 28, 1997.

HOTHORN, T.; BRETZ, F.; WESTFALL, P. Simultaneous Inference in General Parametric Models. **Biometrical Journal**, v. 50, n. 3, p. 346 - 363, 2008.

HUANG, Z.; GUAN, C.; GUAN, X. Cloning, characterization and expression of a new cry1Ab gene from *Bacillus thuringiensis* WB9. **Biotechnol. Lett.**, v. 26, n.20, p. 1557 - 1561, 2004.

HUEHNE, P. S.; LERTWIRIYAWONG, B.; CHANPAISAENG, J. Cloning of *Bacillus thuringiensis* cryIE(a) gene effecting *Spodoptera exigua* in Thailand. Nucleotide sequence from EMBL/GenBank/DDBJ databases. GI:142751, 2005.

JENKINS, W. R. A rapid centrifugal flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Reporter**, St. Paul, v.48, n.9, p.692 - 695, 1964.

JONATAN, T. Introduction of environmental studies. 3rd ed. New York: **Saunders College**, p. 304, 1989.

JOUANIN, L.; BOTTINO, M. B.; GIRARD, C.; MORROT, G.; GIBAND, M. Transgenic plants for insect resistance – review. **Plant Science**, Shannon, v.131, p.1 - 11, 1998.

KAO, S. S.; HSIEH, F. C.; TZENG, C. C.; TSAI, Y. S. Cloning and expression of the insecticidal crystal protein gene Cry1Ca9 of *Bacillus thuringiensis* G10-01A from Taiwan granaries. **Current Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 295 - 299, 2003.

KANE, J. F. Effects of rare codons clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. **Curr. Opin. Biotechnol.**, Londres, v.6, n.5, p.494 - 500, 1995.

KARIM, S.; RIAZUDDIN, S.; GOULD, F.; DEAN, D. H. Determination of receptor binding properties of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins to cotton bollworm (*Helicoverpa zea*) and pink bollworm (*Pectinophora gossypiella*) midgut brush border membrane vesicles. **Pestic. Biochem. Physiol**, v. 67, p. 198 - 216, 2000.

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 insect specificity. **Biochemical and Biophysical Acta**, v. 924, p. 509 - 518, 1987.

KONGSUWAN, K.; GOUGH, J.; KEMP, D.; MCDEVITT, A.; AKHURST, R. Characterization of a new *Bacillus thuringiensis* endotoxin, Cry47Aa, from strains that are toxic to the Australian sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 252, p. 127 - 136, 2005.

KRYWUNCZYK, J.; FAST, P. G. Sorological relationships of the crystals of *Bacillus thuringiensis* var. israelensis. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 36, p. 139 - 140, 1980.

KUMAR, S.; UDAYASURIYAN, V. Cloning of *cry2Aa* and *cry2Ab* genes from new isolates of *Bacillus thuringiensis* and their expression in recombinant *Bacillus thuringiensis* and *Escherichia coli* strains. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 11 - 17, 2004.

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 NusA-Cry protein fusions. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 88, p. 83 - 86, 2005.

KUMAR, S.; CHANDRA, A.; PANDEY, K. C. *Bacillus thuringiensis* (Bt) transgenic crop: an environment friendly insect-pest management strategy. **Journal of Environmental Biology**, Muzaffarnagar, v. 29, p. 641 - 653, 2008.

KUO, W. S.; CHAK, K. F. Identification of novel *cry*-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains on basis of restriction fragment length polymorphism of the PCR Amplified DNA. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 62, n. 4, p. 1369 - 1377, 1996.

LARA, F. J. S. Hibridação de Ácidos Nucléicos. Ribeirão Preto. 2.ed. p. 127, 2002.

LAURSEN, B. S.; SORENSEN, H. P.; MORTENSEN, K. K.; PETERSEN, H. U. S. Initiation of protein synthesis in bacteria. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, Nova York, v. 69, n. 1, p. 101 - 123, 2005.

LIMA, A. S. G.; GUIDELLI, A. M.; ABREU, I. L.; LEMOS, M. V. F. Identification of new isolates of *Bacillus thuringiensis* using rep-PCR products and delta-endotoxin electron microscopy. **Genetics and Molecular Biology**, v. 25, n. 2, p. 225 - 229, 2002.

LI, J.; CARROLL, J.; ELLAR, D. J. Crystal structure of insecticidal delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2,5 Å resolution. **Nature**, v. 353, p. 815 - 821, 1991.

LI, X. Q.; WEI, J. Z.; TAN, A.; AROIAN, R. V. Resistance to root-knot nematode in tomato roots expressing a nematicidal *Bacillus thuringiensis* crystal protein. **Plant Biotech**, p. 455 - 464, 2007.

MARMUR, J. A. Procedure for the Isolation of Deoxyribonucleic Acid from Microorganisms. **Journal Molecular Biology**, v. 3, p. 208 - 218, 1961.

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

MARROQUIN, L. D.; ELYASSNIA, D.; GRIFFITTS, J. S.; FEITELSON, J. S.; AROIAN, R. *Bacillus thuringiensis* (Bt) Toxin Susceptibility and Isolation of Resistance Mutants in the Nematode *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, v. 155, 1693 - 1699, 2000.

MASSON, L., LU, Y. J.; MAZZA, A.; BROUSSEAU, R.; ADANG, M. J. The CryIA(c) receptor purified from *Manduca sexta* displays multiple specificities. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 20309 - 20315, 1995.

MELATTI, V. M. Seleção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* tóxicas ao pulgão do algodoeiro (*Aphis gossypii*). 2008. 101 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Brasília.

MURRAY, M. G.; THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, Standford, v.8, n. 19, p. 4321 - 4325, 1980.

MOAR, W. J.; TRUMBLE, J. T.; HICE, R. H.; BACKMAN, P. A. Insecticidal Activity of the CryIIA Protein from the NRD-12 Isolate of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* Expressed in *Escherichia coli* and *Bacillus thuringiensis* and in a Leaf-Colonizing Strain of *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 3, p. 896 - 902, 1994.

MONNERAT, R. S.; BRAVO, A. Proteínas Bioinseticidas produzidas pela Bactéria *Bacillus thuringiensis*: Modo de ação e Resistência In: Melo, I. S. e Azevedo, J. L. (orgs). Controle Biológico. Jaguariúna. Embrapa Meio Ambiente, p.163 - 200. 2000.

MONNERAT, R. G.; SANTOS, R. C.; BARROS, P. C.; BATISTA, A.; BERRY, C. Isolamento e caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* endofíticas de algodão. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, Brasília, p. 4, 2003.

MORSE, R. J.; YAMAMOTO, T.; STROUD, R. M. Structure of Cry2Aa suggests an unexpected receptor binding epitope. **Structure**, v.9, p.409 - 417, 2001.

NORDMEYER, D. The search for novel nematocidas: Nematology from molecule to Ecosystem. In: GOMMERS, F. J.; MAAS, P. W. p. 281 - 293. **European Society of Nematologists**, p. 306, 1992.

OOI, P. A. C. Diamondback Moth in Malaysia, p. 25-34. In: TALEKAR, N. S.; GRIGGS, T. D. (ed.), Diamondback Moth Management. **Proceedings of the First International Workshop**, Taiwan, p. 495, 1986.

PARENTE, A. F. A. Expressão de GFP em *Bacillus thuringiensis* S76 uma estirpe selvagem ativa para Lepidoptera. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) - Universidade de Brasília. 2009. 103f.

PARRA, J. R. P.; BOTELHO, P. S.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; BENTO, J. M. Controle Biológico: Terminologia. In: In: PARRA, J. R. P. et al. (ed). **Controle Biológico no Brasil: Parasitóides e Predadores**. São Paulo, p. 1 - 16, 2002.

PAYNE, J.; NARVA KE, F. U. (1998) USA Patent, 5831011.

PAYNE, J. M.; KENNEDY, M. K.; RANDALL, J. B.; MEIER, H.; UICK, H. J.; FONCERRADA, L.; SCHNEPF, H. E.; SCHWAB, G. E.; FU, J.(1997). U.S. Patent, 5596071.

PEFERÖEN, M. Progress and prospects for field use of Bt genes in crops. **Trends in Biotechnology**, v. 15, n. 50, p. 173 - 177, 1997.

PINHEIRO, J., BATES, D., DEBROY, S. Deepayan Sarkar and the R Core team. nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R package version 3. p. 1 - 96, 2009.

PINTO, L. M. N.; FIUZA, L. M. Distribuição de genes *cry* de *Bacillus thuringiensis* isolados de solos do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 33, n. 4, 2003.

POLANCZYK, R. A.; ALVES, S. B. *Bacillus thuringiensis*: Uma breve revisão. **Agrociencia** v. 7, p. 1 - 10, 2003.

POLANCZYK, R. A.; VALICENTE, F. H.; BARRETO, M. R. Utilização de *Bacillus thuringiensis* no controle de pragas agrícolas na América Latina, p.111 - 136. In S. B. ALVES & R. B. LOPES (eds.). **Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios**. Piracicaba, FEALQ, 414, p. 44, 2008.

PRAÇA, L. B.; BATISTA, A. C.; MARTINS, E. S.; SIQUEIRA, C. B.; DIAS, D. G. S.; GOMES, A. C. M. M.; FALCÃO, R.; MONNERAT, R. G. Estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera. **Pesq. Agropec. Bras**,v. 39, p 11 - 16, 2004.

PRASAD, S. S. S. V.; TILAK, K. V. B. R.; GOLAKOTE, K. G. Role of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* on the larval survivability and egg hatching of *Meloidogyne* spp., the causative agent of root-knot disease. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 20, p. 377 - 378, 1972.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H. J. (2000) [Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers](#). In: KRAWETZ S, MISENER S (eds) **Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology**. Humana Press, Totowa, NJ, p 365 - 386 [Source code available at http://fokker.wi.mit.edu/primer3/](http://fokker.wi.mit.edu/primer3/).

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. NY. 3.ed. 2001.

SASSER, J. N.; FRECKMAN, D. W. A word perspective on Nematology: the role of the Society. In: VEECH, J.A. & D.W. DICKSON (ed). **Vistas on Nematology: a comemoration of the twenty-fifth anniversary of the Society of Nematologists. Hyattsville (MD)**. EUA: Society of Nematologists, 1987, p. 7 – 14.

SAUKA, H.D.; COZZI, G. J.; BENINTENDE, B. G. Screening of *cry2* genes in *Bacillus thuringiensis* isolates from Argentina. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 88, p. 163 - 165, 2005.

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

SCHNEPF, E. H.; SCHWAB, G. E.; PAYNE, J.; NARVA, K. E. Foncerrada L Nematicidal proteins. **Mycogen Corporation**, USA, 2003.

SCHWEMBER, A. R. An update on genetically modified crops. **Ciencia e Investigacion Agraria**, Santiago do Chile, v. 35, n. 3, p. 231 - 250, 2008.

SHARMA, R. D. *Bacillus thuringiensis*: a biocontrol agent of *Meloidogyne incognita* on barley. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 17, N.1, p. 5, 1993.

SHARMA, R. D. *Bacillus thuringiensis*: um agente biocontrolador do nematóide de cisto da soja. In: Seminário nacional sobre nematóide de cisto da soja *Heterodera glycines*, V.1, 1993, Brasília. **Anais. Brasília: Embrapa-SP**, p. 226 - 231, 1994.

SHARMA, V.; WALIA, S.; KUMAR, J.; NAIR, M. G.; PARMAR, B. S. An efficient method for the purification and characterization of nematicidal Azadirachtins A, B, and H, using HPLC and ESIMS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 3966 - 3972, 2003.

SHI, Y.; MA, W.; YUAN, M.; SUN, F.; PANG, Y. Cloning of vip1/vip2 genes and expression of Vip1Ca/Vip2Ac proteins in *Bacillus thuringiensis*. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 23, p. 501 - 507, 2007.

SICK, A. J.; SCHWAB, G. E.; GEORGE, E.; PAYNE, J. M. (1994). US patent, 5281530.

SILVA-FILHO, M. C.; FALCO, M. C. Plantas transgênicas no melhoramento. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S. DE.; VALADARES-INGLIS, M. C. (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento-plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p. 1011 - 1056.

SILVA, A. R.; SANTOS, J. M. Nematóides na cultura da batata no Brasil. Itapetininga: ABBA, p. 55, 2007.

SINDAG ESTATÍSTICAS DO SETOR DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS. Sindicato Nacional das Indústrias de produtos para Defesa Agrícola, 2003. Disponível em: <<http://www.sindag.com.br/html/estatistica.html>>. Acesso em: 17 de dezembro 2003.

SONG, F.; ZHANG, J.; GU, A.; WU, Y.; HAN, L.; HE, K.; CHEN, Z.; YAO, J.; HU, Y.; LI, G.; HUANG, D. Identification of cry1I-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains and characterization of a novel cry1I-type gene. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 69(9), p. 5207-5211, 2003.

SOUZA, B. S. B. Produção de Bioinseticidas. Disponível em: <<http://www.ebah.com.br/producao-de-bioinseticidas-doc-a11294.html>> Acesso em: 29 de Novembro de 2008.

SUN M.; LIU, Z.; YU, Z. Crystal protein gene *cry032* active against plant parasitic nematodes from *Bacillus thuringiensis* YBT-032. 1999. Nucleotide sequence from EMBL/GenBank/DDBJ databases. GI:17979618.

STARR, J.L.; COOK, R.; BRIDGE, J. Plant resistance to parasitic nematodes. **Wallingford: CABI**, p. 258, 2002.

STOBDAN, T. et al. Cloning and nucleotide sequence of a novel *cry* gene from *Bacillus thuringiensis*. **Biotechnol. Lett.**, v. 26, p. 1153 -1156, 2004.

SZEWCZYK, B.; CARVAJAL, L. O.; PALUSZEK, M.; SKRZECZ, I.; SOUZA, M. L. Baculoviruses - re-emerging biopesticides. **Biotechnol. Adv.**, v. 24, n.2, p. 143 - 160, 2006.

TABASHNIK, B. E.; GROETERS, F. R.; FINSON, N.; LIU, Y. B.; JOHNSON, M. W.; HECKEL, D. G.; LUO, K.; ADANG, M. J. Resistance to *Bacillus thuringiensis* in *Plutella xylostella* - the moth heard round the world. In: BROWN, T. M. (org.) Molecular genetics and evolution of pesticide resistance. **American Chemical Society**. Washington. 1996. p.130 – 140.

TABASHNIK, B. E.; GASSMANN, A. J.; CROWDER, D. W.; CARRIÈRE, Y. Insect resistance to B.t crops: evidence versus theory. **Nat. Biotechnol.** v. 26, p. 199 - 202, 2008.

TAILOR, R.; TIPPETT, J.; GIBB, G.; PELLIS, S.; PIKE, D.; JORDAN, L.; ELY, S. Identification and Characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* Delta-Endotoxin Entomocidal to Coleopteran and Lepidopteran Larvae. **Mol. Microbiol.**, v. 6, p. 1211 - 1217, 1992.

TOWBIN, H.; STAEBLIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamid gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v.76, p.4350-4354, 1979.

TOUNSI, S.; JAOUA, S. Characterization of a novel cry2Aa-type gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaki. **Biotechnology Letters** . v. 25, p. 1219 - 1223, 2003.

VANRIE, J.; JANSSENS, S.; HÖFTE, H.; DEGHEELE, D.; VAN MELLAERT, H. Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. Importance of specific receptors on the brush border membrane of the mid-gut of target insects. **Eur. J. Biochem.**, v. 186, p. 239 - 247, 1989.

WANG, G.; CASTIGLIONE, S.; YING, C.; LING, L.; YIFAN, H. YINGCHUAN, T.; GABRIEL, D. W.; YINONG, H.; KEQIANG, M.; SALA, F. Poplar (*Populus nigra* L.) plants transformed with a *Bacillus thuringiensis* toxin gene: insecticidal activity and genomic analysis. **Transgenic Res.**, Italy, v. 5, p. 289 - 301, 1996.

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

WARD, E. S.; ELLAR, D. J.; NICHOLLS, C. N. Single amino acid changes in the *Bacillus thuringiensis* var. israelensis d-endotoxin affect the toxicity and expression of the protein. **J. Mol. Biol.**, v. 202, p. 527 - 535, 1988.

WEI, J. Z.; HALE, K.; CARTA, L.; PLATZER, E.; WONG, C. T.; FANG, S. C. T.; AROIAN, R. V. *Bacillus thuringiensis* crystal proteins that target nematodes.2003. <www.pnas.orgcgidoi10.1073pnas.0538072100>

WILSON, K. Large-scale CsCl prep of bacterial genomic DNA. In: AUSUBEL, F. M., et al (orgs). **Current protocols in molecular biology**. Brooklyn, N.Y. Green Publishing Associates, 1987. p. 243 – 245.

WHITELEY, H. R.; SCHNEPF, H. E. The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Microbiology**, v. 40, p. 549 - 576, 1986.

ZHANG, L. L.; LIN, J.; LUO, L.; . GUAN, C. Y.; ZHANG, Q. L.; GUAN, ZHANG, Y.; JI, J. T.; Z.P. HUANG, Z. P.; GUAN, X. A novel *Bacillus thuringiensis* strain LLB6, isolated from bryophytes, and its new cry2Ac-type gene. **Letters in Applied Microbiology**, v. 44 p. 301 - 307, 2007.

ZHENG, D., CRUZ, N.; ARMENGOL, G.; SEVREZ, C.; OLAYA, J.; YUAN, Z.; ORDUZ, S.; CRICKMORE, N. Co-Expression of the Mosquitocidal Toxins Cyt1Aa and Cry11Aa from *Bacillus thuringiensis* Subsp. israelensis in *Asticcacaulis excentricus*. **Current Microbiology** v. 54, p. 58 - 62, 2007.

ZHONG, C.; ELLAR, D. J.; BISHOP, A.; JOHNSON, C.; LIN, S.; HART, E. R. Characterization of a *Bacillus thuringiensis* delta - endotoxin which is toxic to insects in three orders. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, US, v. 76, n.2, p. 131 - 139, 2000.

ZUCKERMAN, B. M.; DICKLOW, M. B.; ACOSTA, N. A strain of *Bacillus thuringiensis* for the control of plant-parasitic nematodes. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 3(1), p. 41-46, 1993.