

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

EXPRESSÃO DOS GENES *vip3Aa* E *cry1la* EM *Escherichia coli* EFETIVOS NO CONTROLE DE *Spodoptera frugiperda*

Deise Reis de Paula Mendes

Bióloga

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Julho 2011

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

**EXPRESSÃO DOS GENES *vip3Aa* E *cry1la* EM *Escherichia coli*
EFETIVOS NO CONTROLE DE *Spodoptera frugiperda***

Deise Reis de Paula Mendes

Orientador: Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério

Co-Orientador: Prof. Dr. Odair Aparecido Fernandes

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

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Julho 2011

Mendes, Deise Reis de Paula
M538e Expressão dos genes *Vip3Aa* e *Cry1Ia* em *Escherichia coli*
efetivos no controle de *Spodoptera frugiperda* / Deise Reis de Paula
Mendes. – – Jaboticabal, 2011
ix, 59 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2011
Orientadora: Janete Aparecida Desidério
Banca examinadora: Cristina Lacerda Soares Petrarolha Silva,
Manoel Victor Franco Lemos

Bibliografia

1. Controle biológico. 2. Bioinseticida. 3. Proteína recombinante.
Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 631.52:632.937

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

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

DEISE REIS DE PAULA MENDES – nasceu em 22 de agosto de 1984 em Cristais - MG. Terminou o ensino médio em 2002. Ingressou na Universidade em 2004, concluindo o curso de Ciências Biológicas pela Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira – UNESP – Ilha Solteira - SP em 2008. Em 2009 iniciou o mestrado na área de Genética e Melhoramento de Plantas, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Jaboticabal - SP.

DEDICATÓRIA

Aos meus Pais Nivaldo e
Rosângela, pela luta, esforço,
dedicação e pelo exemplo de vida.

Aos meus avôs Zezinho e
Aparecida, pelo amor incondicional.
Especialmente ao meu esposo Hélio.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade de vida;

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

Ao Prof. Dr. Odair Aparecido Fernandes, pela co-orientação, incentivo e disposição em todo momento.

À Profa. Dra. Cristina Lacerda Soares Petrarolha Silva, pelos ensinamentos, dedicação, por ter acreditado em mim durante estes anos, sou muito grata pelas oportunidades e por contribuir para meu crescimento profissional, o meu muito obrigada.

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

Ao Prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos, pelo incentivo, amizade e contribuições valiosas;

À Dra. Flávia Maria de Souza Carvalho e Júlio Cesar Bortolossi, pelo auxílio e sugestões de como proceder nos experimentos iniciais com expressão de proteína;

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo;

À Vivian Boter Bergamasco, pela amizade e disponibilidade, sempre presente, e pela colaboração na realização do experimento;

Aos membros da banca de avaliação da qualificação: Prof. Dr. Jackson Antônio Marcondes de Souza Freitas e Profa. Dra. Sonia Marli Zingaretti pelas sugestões, que contribuíram para o aperfeiçoamento deste estudo;

À Eliane Cristina da Cunha Alves pela amizade, pronto atendimento, atenção e disposição;

Ao meu querido companheiro Hélio, pela ajuda e incentivo;

Aos amigos Flávio, João, Suzana Marucci, Camila Figueiredo, Ana Rita, Juliana Rossi e Thiago, pela ajuda, amizade, carinho e auxílio sempre que precisei;

À equipe do laboratório do Prof. Dr. Hélio J. Montassier, pelo uso do laboratório, pelo apoio e receptividade;

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

À equipe do laboratório do Prof. Dr. Odair Aparecido Fernandes, pelo apoio e receptividade e grande apoio na realização dos bioensaios;

Aos funcionários do Departamento de Biologia Aplicada à agropecuária, pela assistência e disposição;

Aos meus irmãos Klinger e Thais, pelo carinho e incentivo.

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

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

SUMÁRIO

Página

RESUMO.....	viii
SUMMARY.....	ix
I – INTRODUÇÃO	1
II – OBJETIVO GERAL.....	3
2.1. Objetivos Específicos.....	3
III - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1. Controle biológico de pragas	4
3.2. Bactéria <i>Bacillus thuringiensis</i>	5
3.3. Proteínas Cry1I produzidas por <i>B. thuringiensis</i>	8
3.4. Proteínas Vip3A produzidas por <i>B. thuringiensis</i>	9
3.5. Toxicidade das toxinas de <i>B. thuringiensis</i> em <i>Spodoptera frugiperda</i>	11
IV. MATERIAL E MÉTODOS	14
4.1. Linhagens bacterianas utilizadas	14
4. 2. Extrações do DNA genômico para reações de PCR.....	14
4.3. Determinação da presença do gene <i>vip3Aa</i>	15
4.4. Clonagem e transformação bacteriana	17
4.5. Determinação de orientação correta de clonagem do gene <i>vip3Aa</i>	19
4.6. Confirmação da fase correta de leitura	19
4.7. Expressão da proteína Vip3Aa recombinante em <i>E. coli</i>	21
4.8. Detecção da proteína Vip3Aa por Western Blotting	22
4.9. Purificação da Proteína Vip3Aa	23

4.10. Indução da expressão e purificação da proteína Cry1la	24
4.11. Bioensaios com <i>Spodoptera frugiperda</i>	25
4.12 – Bioensaios de Concentração Letal Média (CL ₅₀) para proteínas Vip3Aa e Cry1la	25
V . RESULTADOS	27
5.1. Amplificação, clonagem e expressão do gene <i>vip3Aa</i>	27
5.1.1. Clonagem e sequenciamento do gene <i>vip3Aa</i>	27
5.1.2. Expressão e purificação da proteína Vip3Aa	32
5.2. Expressão e purificação da proteína Cry1la	35
5.3. Bioensaios com <i>Spodoptera frugiperda</i>	38
VI. DISCUSSÃO	40
VII. CONCLUSÕES	46

EXPRESSÃO DOS GENES *vip3Aa* E *cry1la* EM *Escherichia coli* EFETIVOS NO CONTROLE DE *Spodoptera frugiperda*

RESUMO - Proteínas inseticidas derivadas de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) são os inseticidas biológicos mais amplamente utilizados. O trabalho teve por objetivo avaliação da toxicidade das proteínas de *Bt*, Cry1Ia e Vip3Aa, expressas em *Escherichia coli* BL21 (DE3), a fim de verificar a eficiência destas toxinas na mortalidade de *Spodoptera frugiperda*. Para tanto, empregou-se um par de iniciadores específicos para amplificar o fragmento correspondente ao gene *vip3Aa* completo contendo 2370 pb. O fragmento obtido foi clonado no vetor pET SUMO e transformado em células de *E. coli* BL21 (DE3) por choque térmico. A expressão das proteínas Vip3Aa e Cry1Ia previamente clonado, foi induzida por tiogalactopiranosídeo de isopropila (IPTG), e as proteínas recombinantes com peso molecular de, aproximadamente, 100 e 81 KDa respectivamente, foram detectadas por SDS-PAGE e Western Blot. Para avaliação da toxicidade os bioensaios foram realizados com as lagartas de primeiro instar que foram alimentadas com dietas artificiais contendo, na superfície, cinco diferentes concentrações da toxina Cry1Ia e cinco diferentes concentrações da toxina Vip3Aa recombinante. Os bioensaios foram estabelecidos em delineamento inteiramente casualizado, com 16 lagartas por repetição, totalizando 4 repetições por tratamento. A quantificação de lagartas mortas pela ação do *B. thuringiensis*, foi determinada pela CL₅₀. Os resultados demonstraram a eficiência do sistema bacteriano na expressão das proteínas Vip3Aa e Cry1Ia de *B. thuringiensis*, resultando em toxinas recombinantes com elevada toxicidade frente às lagartas de *S. frugiperda*, o que sugere o uso destes genes na obtenção de plantas transgênicas, únicas ou piramidada, resistentes a esta praga.

Palavras-chave: controle biológico, bioensaios, toxinas *BT*, lepidoptera

EXPRESSION OF GENES *vip3Aa* AND *cry1Ia* IN *Escherichia coli* EFFECTIVE IN CONTROL OF *Spodoptera frugiperda*

SUMMARY – Insecticidal proteins derived from *Bacillus thuringiensis* (Bt) are the most widely used biological insecticides. The study aimed to evaluate the toxicity of Bt proteins, Cry1Ia Vip3Aa and expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3) to verify the efficiency of these toxins on the mortality of *Spodoptera frugiperda*. For this we used a pair of specific primers to amplify the fragment corresponding to the gene *vip3Aa* complete containing 2370 bp. The fragment was cloned into pET SUMO vector and transformed into cells of *E. coli* BL21 (DE3) by heat shock. The expression of proteins Vip3Aa and Cry1Ia previously cloned, was induced by isopropyl tiogalactopiranosídeo (IPTG), and the recombinant proteins with a molecular weight of approximately 100 and 81 kDa respectively, were detected by SDS-PAGE and Western blot. To evaluate the toxicity bioassays were performed with first instar caterpillars that were fed diets containing artificial, in surface, whit five different toxin concentrations of Cry1Ia and five different concentrations of recombinant toxin Vip3Aa. Bioassays were established in a randomized design, with 16 larvae per repetition, totaling four replicates per treatment. The quantification caterpillar dead by the action of *B. thuringiensis*, was determined by LC₅₀. The results demonstrated the efficiency of the bacterial system in protein expression Vip3Aa Cry1Ia of *B. thuringiensis* toxins, resulting in recombinants with high toxicity against the larvae of *S. frugiperda*, suggesting the use of these genes in the production of transgenic plants, single or pyramided resistant to this pest.

Keywords: biological control, bioassays, BT toxins, lepdoptera

I – INTRODUÇÃO

Há vários anos os países industrializados têm iniciado a busca de sistemas de controle biológico menos tóxicos para os humanos e o ecossistema em geral, de maior eficiência e especificidade. Esta tendência se acentuou nos últimos anos porque uma porcentagem elevada dos pesticidas químicos de uso atual saiu do mercado por problemas de toxicidade e dano ecológico. A dependência de fertilizantes oriundos do petróleo, o aumento da demanda de produtos livres de resíduos de agrotóxicos e os avanços científicos e tecnológicos, obtidos pela recente introdução de ferramentas da biologia molecular, foram fatores que impulsionaram a adoção e o uso do controle biológico como alternativa à utilização dos defensivos químicos.

Em busca de métodos menos agressivos ao ambiente, no combate a insetos pragas, têm se iniciado sistemas de controle biológico utilizando microorganismos (PRAÇA et al., 2004). Dentre os agentes empregados no controle biológico, *Bacillus thuringiensis*, se destaca por apresentar atividade entomopatogênica contra um largo espectro de hospedeiros pertencentes às ordens: Lepidoptera, Coleoptera, Diptera (LERECLUS et al., 1993).

Formulações comerciais baseados em *B. thuringiensis* são utilizadas para o controle biológico de pragas em muitas culturas, principalmente na agricultura orgânica. Esse agente de controle biológico tem alta especificidade e é relativamente seguro para organismos não alvo, mas apresenta limitações relativas à persistência e eficiência.

Essas limitações levaram pesquisadores a investir no desenvolvimento de culturas geneticamente modificadas para expressar toxinas oriundas da bactéria *B. thuringiensis*. Nas últimas décadas, genes oriundos da bactéria *B. thuringiensis* responsáveis pela expressão de proteínas inseticidas têm sido incorporados em espécies de plantas cultivadas tais como milho (*Zea mays* L.) e algodão (*Gossypium hirsutum* L.) (SYNGENTA, 2005).

Com a crescente liberação dos cultivos *Bacillus thuringiensis* para plantio e comercialização, há a necessidade de se avaliar possíveis surgimentos de resistência

dos insetos pragas às culturas geneticamente modificadas com genes das toxinas *cry1I* e *vip3A* de *B. thuringiensis*, que porventura venham a ser introduzidas no país, para o controle de pragas da ordem Lepidoptera, como *Spodoptera frugiperda*, responsável por causar danos e reduções nos rendimentos da cultura de milho.

Um dos principais riscos ambientais associados às culturas inseticidas é o potencial de evolução de resistência em pragas alvo. Insetos evoluem em resposta à seleção natural imposta pelos métodos de controle, limitando sua eficiência e viabilidade em longo prazo (HAWTHORNE, 1998). Mais de 500 espécies de insetos se tornaram resistentes a inseticidas convencionais e existe evidência empírica de que eles também podem adaptar-se à toxina *B. thuringiensis*.

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

De acordo com o modo de ação das toxinas analisadas, estas poderão ser empregadas na construção de plantas piramidadas de milho, com mais de um transgene de *B. thuringiensis*, diminuindo as chances de os insetos se tornarem resistentes, além de se determinar padrões plausíveis de resistência cruzada.

Considerando todas as explanações anteriores, os objetivos do presente estudo foram clonar em vetor de expressão o gene *vip3Aa* do isolado HD-125, expressar as proteínas Cry1Ia e Vip3Aa em *E. coli* BL21 (DE3) e avaliar sua atividade inseticida frente às larvas de *S. frugiperda*.

II – OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a toxicidade das proteínas de *B. thuringiensis*, Cry1Ia e Vip3Aa, expressas em *E. coli* BL21 (DE3), a fim de verificar a eficiência destas toxinas na mortalidade de *S. frugiperda*.

2.1. Objetivos Específicos

- Clonar em vetor de expressão o gene *vip3Aa* de um isolado *B. thuringiensis* HD-125.
- Purificar as proteínas Cry1I e Vip3A a partir de *E. coli* BL21 (DE3) .
- Verificar a eficiência das proteínas Vip3Aa e Cry1Ia na mortalidade das larvas de *S. frugiperda* através de bioensaios.

III - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Controle biológico de pragas

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). Nesse sentido, 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. Portanto, os agentes de controle biológico, são uma alternativa viável a esse fim (PRAÇA et al., 2004). 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).

A busca por métodos alternativos de controle de pragas na agricultura pode levar a um aumento na produção de grão, 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). A aplicação de inseticidas microbianos tem se destacado, dentre as estratégias de controle biológico utilizadas atualmente, principalmente, pelo menor custo desses produtos a outros bioinseticidas (PARENTE, 2007).

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, 2008).

Um dos entomopatogênicos mais utilizados é a bactéria *Bacillus 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, 2008).

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

3.2. Bactéria *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis (Bt) é uma bactéria entomopatogênica gram-positiva, da família Bacillaceae, que se caracteriza pela presença de inclusões cristalinas formadas durante sua esporulação. Esta bactéria encontra-se amplamente distribuída por todo o planeta, devido principalmente à sua capacidade esporulante, o que lhe confere uma elevada resistência ao calor e à seca (POLANCZYK et al., 2008). Foi descrita pela primeira vez por Berliner em 1911 quando este pesquisador isolou o bacilo de *Anagasta kuehniella*. Posteriormente, ele o nomeou de *B. thuringiensis* em homenagem a

província de Thuringia (Alemanha), onde o primeiro inseto infectado foi encontrado (GLARE & O'CALLAGHAM, 2000).

Esta bactéria produz uma inclusão protéica de formato cristalino, que confere a característica entomopatogênica. Este cristal, sintetizado durante a fase de esporulação, é formado por polipeptídeos denominados proteínas Cry ou δ -endotoxinas (YAMAMOTO & DEAN, 2000) que vão sendo acumuladas dentro da célula bacteriana, liberados juntamente com esporos no momento da lise celular. Produz também uma classe de proteínas chamadas Vips (proteínas inseticidas vegetativas) que são produzidas e secretadas durante a fase de crescimento vegetativo da bactéria (ESTRUCH et al., 1996).

Atualmente têm sido descritos mais de 300 genes de δ -endotoxinas classificadas em 49 grupos Cry e 02 grupos Cyt, de acordo com a homologia da sequência de aminoácidos (http://www.biols.susx.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/toxins2.html). Quanto ao modo de ação das δ -endotoxinas de *B. thuringiensis*, o modelo atual tem sido estudado principalmente em lepidópteros, ainda que certos trabalhos mostrem características muito similares em outras ordens de insetos.

Após a ingestão, os cristais de *B. thuringiensis* passam praticamente intactos através da primeira porção do tubo digestivo. Posteriormente, e principalmente em função do pH intestinal do inseto, das características e composição do cristal, estes serão solubilizados liberando peptídeos sem atividade inseticida que recebem o nome de protoxinas. Cada tipo de toxina terá suas condições ótimas de solubilização, assim as toxinas ativas contra lepidópteros se dissolvem em pH alcalino, enquanto as toxinas ativas contra coleópteros o fazem em pH neutro (KOLLER et al., 1992). Assim, sugos intestinais de distintos insetos podem produzir variantes de uma mesma toxina e atividades distintas (HAIDER et al., 1986).

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 pragas é altamente específica, se comparada à maioria dos agentes químicos atuais, além de não afetar outros organismos 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), fato que enseja a busca frequente por novas toxinas.

Muitas linhagens naturais de *B. thuringiensis* foram isoladas em várias áreas geográficas e de diferentes origens, incluindo grãos, solos, superfícies de plantas, insetos vivos ou mortos e a partir de amostras de águas de rios e lagos (BERNHARD et al., 1997).

Dentre os organismos empregados no controle biológico, *B. thuringiensis* se destaca por produzir uma diversidade de toxinas inseticidas, incluindo, exotoxinas, 6 enterotoxinas, Vips e endotoxinas. Apresentado atividade tóxica contra cerca de 130 espécies de insetos das ordens Lepidoptera, Diptera e Coleoptera, estando também incluídas importantes pragas agrícolas brasileiras como *Spodoptera frugiperda*, *Diatraea saccharalis* e *Anticarsia gemmatilis* e vetores de doenças de importância mundial, pertencentes aos gêneros *Aedes*, *Culex* e *Anopheles* (LERECLUS et al., 1993), além de atingir também alguns invertebrados como nematóides, sarcomastigofora e platelmintos (FEITELSON et al., 1993).

Os produtos à base de *B. thuringiensis* são inócuos a mamíferos e vertebrados, não apresentam toxicidade às plantas, não são poluentes e devido a sua grande especificidade, não atingem os inimigos naturais do inseto alvo (SMITS, 1997). Este bacilo é responsável por 90%-95% do mercado de bioinseticidas (VALADARES-INGLIS et al., 1998) e produtos à base deste são comercializados em todo mundo há mais de 50 anos (DIAS et al., 2002).

Algumas populações de pragas de culturas como *Heliothis virescens*, *Plutella xylostella*, *Tricoplusia ni* (ESTADA & FERRE, 1994), *Spodoptera exigua* (MOAR et al., 1995), e *S. littoralis* (MÜLLER-COHN et al., 1996), *Spodoptera frugiperda* (MATTEN et al., 2008) têm apresentado elevados níveis de resistência a proteínas Cry de *B. thuringiensis* em laboratório.

3.3. Proteínas Cry1I produzidas por *B. thuringiensis*

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 de 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 (GRIFFITTS & 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 predizer 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 (BRAVO et al., 2007). 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).

A primeira proteína Cry1I foi caracterizada por TAILOR et al., (1992), tendo muitos outros tipos de genes *cry1I* caracterizados e publicados (CHOI et al., 2000; SONG et al., 2003; TOUNSI et al., 2003) e atualmente são cerca de 15 *cry1I* agrupados em 6 subclasses (*cry1Ia* a *cry1If*) (CRICKMORE et al., 2008). Os genes *cry1I* codificam proteínas em torno de 70 a 80 kDa, que são secretadas na fase vegetativa do crescimento de *B. thuringiensis* e que não se acumulam em cristais (TAILOR et al., 1992; ESCUDEIRO et al., 2006; GROSSI-DE-SÁ et al., 2007). Estas têm sido classificadas como proteínas Cry1I devido à similaridade com aquelas do grupo Cry1 (CRICKMORE et al., 1998). O fato de não estar envolvida na formação do cristal

protéico faz com que esta toxina não seja incluída como ingrediente ativo nos inseticidas baseados em *B. thuringiensis*. Entretanto, a eficiência de Cry1I na proteção de plantas transformadas contra o ataque de insetos tem sido demonstrada (LAGNAOUI et al., 2001; LIU et al., 2004).

No Brasil, um grupo de pesquisadores realizou o isolamento de um novo gene *cry1I*, a partir de um isolado brasileiro de *B. thuringiensis* (Bt S811), o qual denominou de *cry1Ia12*. A proteína recombinante Cry1Ia12, correspondente ao gene *cry1Ia12* expressado em células de *E.coli*, mostrou toxicidade frente a larvas de primeiro instar de *Anthonomus grandis* e *S. frugiperda*, consideradas pragas devastadoras da cultura de milho no Brasil (GROSSI-DE-SÁ et al., 2007).

3.4. Proteínas Vip3A produzidas por *B. thuringiensis*

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

A proteína Vip3A possui atividade inseticida contra um grande espectro de insetos praga de importância agrônômica da ordem Lepidoptera e revela alta bioatividade para: lagarta-rosca (*Agrotis ipsilon*), lagarta-do-cartucho (*S. frugiperda*), lagarta-da-beterraba (*S. exigua*), lagarta-da-espiga (*Helicoverpa zea*) (DOSS et al., 2002).

Segundo AZOL (2006) a proteína Vip3A teve uma eficiência de 62% na mortalidade das larvas de *Spodoptera frugiperda* quando alimentadas com dieta artificial contendo a proteína Vip3A. Estas proteínas são aparentemente secretadas pela célula e por elas não formarem inclusões cristalinas são excluídas pela nomenclatura da proteína Cry (CRICKMORE et al., 1998).

Diferentemente das proteínas Cry as quais unem-se em cristais insolúveis dentro da célula mãe, Vip3A é secretada como proteína solúvel por algumas linhagens de *B.*

thuringiensis durante a fase vegetativa de crescimento, limitando sua aplicação no campo (ARORA et al., 2003).

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

As proteínas Vip possuem toxicidade da mesma magnitude que a das proteínas Cry contra insetos susceptíveis. No entanto, o espectro inseticida das proteínas Vip inclui, ainda, certas pragas importantes, as quais têm mostrado insensibilidade para as proteínas Cry (BHALLA et al., 2005). A ação da proteína Vip3A tem sido examinada e mostra estar no nível do epitélio intestinal do inseto assim como as proteínas Cry. Porém, devido à sua forma solúvel, estas proteínas se ligam mais rapidamente aos receptores de membrana das células epiteliais do intestino do inseto susceptível resultando em progressiva degeneração da camada epitelial (YU et al., 1997).

LEE et al. (2003), compararam o modo de ação da proteína Vip3A com Cry1Ab em experimentos de ativação proteolítica, ligação a BBMV ("Brush Border Membrane Vesicles") e habilidade para formar poros em dois diferentes ensaios *in vitro*. Os autores verificaram que Vip3A difere em várias etapas, quanto ao modo de ação, utilizando um alvo molecular diferente e formando distintos canais iônicos, comparada à Cry1Ab. A interação das proteínas Vip com os receptores do intestino das larvas de diferentes lepidópteros tem colocado essas proteínas como uma segunda geração de toxinas de *B. thuringiensis*, com excelente potencial para o manejo da resistência.

A Syngenta produziu o "Milho ICP4 Pacha-Syngenta", contendo a proteína inseticida Vip3A, a partir do gene *vip3A* de *Bt* AB88 e, recentemente, introduziu o gene *vip3A(a)* que codifica essa proteína inseticida em plantas de algodão, *Gossypium hirsutum* variedade Coker 312, (SYNGENTA, 2005).

Segundo DONOVAN et al. (2001), a proteína Vip3A pode ser sintetizada depois que esporos de *B. thuringiensis* são ingeridos por insetos, sugerindo que uma parte significativa da patogenicidade de *B. thuringiensis* contra *S. exigua* seja devida à

produção de proteína Vip3A dentro de lagartas mortas. A mortalidade seria, então, resultante de germinação de esporos, crescimento e desenvolvimento de células bacterianas depois da ingestão pelas lagartas.

A descoberta da proteína vip3A foi muito importante para o controle biológico de insetos pragas, pois, segundo MONERAT & BRAVO (2000), atualmente não só se aproveitam as misturas de esporos e cristais, obtidos após o cultivo de *B. thuringiensis*, como também é possível utilizar o seu sobrenadante.

3.5. Toxicidade das toxinas de *B. thuringiensis* em *Spodoptera frugiperda*

Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae) é uma praga de difícil controle e um inseto polífago que ataca diversas importantes culturas em muitos países. No Brasil, este inseto é encontrado em diferentes culturas, como milho, sorgo, arroz, trigo, alfafa, feijão, amendoim, tomate, batata, algodão, couve, abóbora, espinafre e couve (MONNERAT et al., 2007).

No Brasil, *S. frugiperda* é popularmente conhecido como “lagarta-do-cartucho”, e possui o hábito de infestar e danificar as folhas jovens da cultura do milho (*Zea mays*) e frequentemente demanda medidas de controle devido seu alto potencial de dano e reduções nos rendimentos da cultura. Este lepidóptero é considerado a principal praga do milho no Brasil, por começar a atuar a partir da emergência das plantas e continuar até a formação das espigas (COELHO et al., 2004). O prejuízo causado gera uma redução na produtividade de até 34%, mais de US\$ 400 milhões por ano (SOARES, 2010)

A lagarta-do-cartucho é controlada basicamente com inseticidas químicos. A utilização abusiva destes produtos tem trazido vários problemas. Estes decorrem desde a falta de especificidade destes produtos, que leva à eliminação de muitos insetos não patogênicos, a sua toxicidade para a espécie humana e animais domésticos, o rápido aparecimento de resistência dos insetos aos mesmos, o seu acúmulo no meio ambiente, ocasionando sérios problemas de poluição, até as somas vultosas que, no

caso do Brasil, são destinadas à importação destes inseticidas químicos (PFEIFER & GRIGIATTI, 1996).

Insetos lepidópteros pertencentes à família Noctuidae tais como espécies de *Spodoptera*, são importantes pragas as quais são fracamente susceptíveis à maioria das endotoxinas. As informações a respeito da susceptibilidade de *S. frugiperda* à família de proteínas Cry são limitadas, apesar de serem encontrados numerosos trabalhos enfocando a interação entre as toxinas e sítios de ligação, bem como o papel das modificações dos sítios de ligação na resistência dos insetos (FERRE & VAN RIE, 2002). Portanto, o conhecimento sobre as interações toxina-receptores é o elemento chave para designar estratégias específicas para prevenir a resistência cruzada em *S. frugiperda*.

Em relação às análises de toxicidade, ligação e permeabilidade das toxinas, LUO et al. (1999), utilizando BBMV, a partir de *S. frugiperda* e *S. exigua*, e comparando os resultados com aqueles obtidos nos bioensaios, verificaram que Cry1Fa foi altamente tóxica e Cry1Ac foi não tóxica para larvas de *S. exigua* e *S. frugiperda*. Já Cry1Ca foi altamente tóxica para *S. exigua* e fracamente tóxica para *S. frugiperda*. Ao contrário, Cry1Bb foi ativa contra *S. frugiperda*, mas pouco ativa contra *S. exigua*.

Ligação de diferentes proteínas cristal de *B. thuringiensis* ao epitélio intestinal de larvas de *S. frugiperda* foi caracterizada, também, por BBMV por ARANDA et al. (1996). Os resultados obtidos pelos autores mostraram que as toxinas interagem com as microvilosidades das células epiteliais de *S. frugiperda* por duas diferentes vias. A primeira é típica das proteínas altamente tóxicas (como Cry1C e Cry1D); esta interação é saturada e específica. A toxina Cry1C liga-se a duas proteínas do epitélio intestinal, enquanto Cry1Ab liga-se a uma única proteína de 150kDa. A ligação desta proteína foi observada, mas foi extremamente fraca, implicando que este tipo de interação ocorre também *in vivo*, embora não esteja relacionada à toxicidade.

Em estudos realizados por RANG et al. (2004), com cinco toxinas Cry1 (Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ba, Cry1Ca e Cry1Ea) para três insetos pragas, entre eles *S. frugiperda*, como parte de uma estratégia para o desenvolvimento de milho transgênico resistente a várias pragas, enquanto permite o manejo da resistência. Particularmente em relação a

S. frugiperda, os autores verificaram que Cry1Ab e Cry1Ac competem para o mesmo sítio de ligação; Cry1Ba e Cry1Ca competem para um segundo sítio de ligação. Cry1Ea reconhece um terceiro sítio de ligação específico em *S. frugiperda* e não compete com nenhuma das outras toxinas.

IV. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Linhagens bacterianas utilizadas

A linhagem de *B. thuringiensis* utilizada como doadora do gene *cry1Ia*, é proveniente do solo de Cubatão-SP e foi isolada, no Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA) do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária da FCAV/UNESP, Jaboticabal – SP, sendo submetida ao “International Entomopathogenic Bacillus Center”, no qual foi catalogada como *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* T01-328. Esta linhagem foi previamente submetida à análise do conteúdo de genes *cry1* por PCR e sequenciamento comprovando a presença do gene *cry1Ia* (ESPINDOLA, 2003). O produto amplificado do gene de interesse foi ligado ao vetor de expressão pET28a(+) (BERGAMASCO, 2009) e transformado em *E. coli* BL21(DE3).

A linhagem doadora do gene *vip3Aa* foi a linhagem padrão *B. thuringiensis* HD-125, cedida pela Embrapa, Sete Lagoas-MG. Este gene foi clonado no vetor de expressão pET-SUMO (Invitrogen) e transformado em *E. coli* BL21(DE3).

As linhagens de *B. thuringiensis* foram mantidas em estoque na forma de fitas de papel impregnadas com esporos e o cultivo feito em meio BHI, (“Brain Heart Infusion”), ou em meio NA (Ágar Nutriente), líquido ou sólido, de acordo com o uso.

4. 2. Extrações do DNA genômico para reações de PCR

O DNA genômico do isolado de *B. thuringiensis* HD125 foi extraído utilizando o protocolo de extração descrito por MARMUR (1961), com modificações. A cultura de *B. thuringiensis* proveniente de 50 ml de meio BHI (“Brain Heart Infusion – médium” – Biobrás) foi centrifugada por 10 min, a 7.400 x *g* a 20 °C. O precipitado bacteriano, em média de 0,5 g, obtido por centrifugação, foi ressuspendido em 6 ml de solução salina [0,15 M NaCl e 0,1 M EDTA (pH 8,0)], adicionado de 0,6 ml de lisozima (10 mg/ml) e

incubado por 1 h a 37°C. Após, foram adicionados 500 µl de SDS 25%, (dodecil sulfato de sódio), agitando-se suavemente a preparação. Em seguida, foi acrescentado acetato de sódio 2,5 M até a concentração final de 1 M. A desproteinização foi feita utilizando-se de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1 v/v) e o sobrenadante coletado após a centrifugação e, em seguida, adicionados 2 volumes de etanol absoluto gelado. O precipitado obtido por centrifugação foi dissolvido em TE [10 mM Tris-HCl (pH 7,4), 1 mM EDTA] no qual foi adicionado 25 µl de RNase (10 mg/ml) e incubado por 30 min a 37°C. Posteriormente, foi submetido novamente a um tratamento com clorofórmio/álcool isoamílico (24:1v/v), e as amostras de DNA precipitadas com 2 volumes de etanol absoluto gelado. As amostras de DNA foram ressuspensas em TE e estocadas a -20 °C até sua utilização.

As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000, e diluídas a uma concentração de 10 ng/µL. Para a análise qualitativa das amostras, uma alíquota de 8 µL das mesmas foi aplicada em gel de agarose 0,8% contendo brometo de etídeo numa concentração de 0,5 µg/ml, e submetida à eletroforese com tampão TBE 1x [Tampão Tris-Borato (0,045 M), EDTA (1 mM)], a 90 V por 1h 30 min. Os fragmentos foram visualizados e documentados por meio de um sistema de fotodocumentação digital (Gel Doc 2000 Bio-Rad).

4.3. Determinação da presença do gene *vip3Aa*

O gene *vip3A* da linhagem de *B. thuringiensis* HD-125 já se encontra sequenciado e a sequência está depositada no GenBank sob o número de acesso L48811. Assim sendo, para o isolamento do gene completo (2,5 Kb), foi feita a amplificação utilizando o par de iniciadores Vip5/Vip6 descrito por LOGUERCIO et al. (2002) (Tabela 1), com o códon ATG inicial e códon de parada.

Tabela 1. Iniciadores específicos para o gene *vip3A*.

Iniciadores	Sequências
Vip5	5' <u>ATG</u> AACAAGAATAATACTAAATTAAGC3'(d)
Vip 6	5'GATC <u>TTA</u> CTTAATAGAGACATGC3'(r)

(d): direto; (r): reverso. ATG e TTA sublinhados representam o códon de início e o códon de parada, respectivamente.

A reação de amplificação do gene completo partindo do códon de iniciação até o códon de parada foi realizada utilizando-se do par de iniciadores Vip5 e Vip6, conduzida em um volume de 50 µL conforme a seguir: aproximadamente 50 ng da amostra de DNA total, 5,0 µL de tampão da PCR (10X PCR High Fidelity PCR buffer), 10 mM dNTP mixture (1,0 µl), 2,0 mM MgSO₄ (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. Em todas as reações de amplificação foi feito um controle negativo, substituindo o volume de DNA por água Milli-Q estéril.

As reações foram conduzidas em aparelho Termociclador (PTC-200 “Programmable Thermal Controller” – MJ Research, inc.) utilizando o seguinte programa: 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 Taq DNA Polimerase e uma polimerase com atividades 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). Para aumentar a eficiência de clonagem, após o término da ciclagem, foi adicionado 0,5 unidades de enzima Taq DNA

polimerase (Gibco-BRL) 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.

Em seguida, 4 µl de azul de bromofenol (0,5% de azul de bromofenol em glicerol 50%) foi adicionado à 4 µL de cada amostra e logo após aplicadas em gel de agarose 1,5%, contendo brometo de etídio (0,5 µg/ml) e submetido a corrida eletroforética por, aproximadamente, 2 hs a 70 V em tampão TEB [1X] (89 mM de Tris; 89 mM de ácido bórico e 2,5 mM de EDTA, pH 8,2). Os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados pela incidência de luz UV e documentados em um fotodocumentador modelo GEL DOC 2000 (BIO-RAD).

4.4. Clonagem e transformação bacteriana

O produto da PCR obtido, referente ao gene *vip3Aa* da linhagem HD-125, foi clonado no vetor de expressão pET-SUMO (Invitrogen), para a produção da proteína fusionada a uma etiqueta de HIS-6-SUMO na porção N-terminal da proteína (Figura 1). A ligação do inserto ao vetor continha 1 µl de produto de PCR (~ 100 ng), 1 µl de tampão Ligation Buffer 10x (Invitrogen), 2 µl do vetor do vetor pET SUMO a 25 ng/ µl (Invitrogen) e 5 µl de água estéril (Invitrogen). A ligação foi incubada por 16 horas a 15 °C.

Após ligação no vetor pET-SUMO, a construção foi transformada em células de multiplicação quimicamente competente de *E. coli* BL21 (DE3), com as seguintes condições: 2 µl da ligação foi separada e adicionada no tubo que continha a célula competente, a qual foi incubada 30 minutos no gelo, posteriormente 30 segundos em “banho maria” a 42 °C voltando rapidamente para o gelo, em seguida adicionado 250 µl de meio SOC (Invitrogen) e mantido sobre agitação 200 rpm por 1 hora, foi espalhada na placa de petri com meio de cultura Luria-Bertani (LB) sólido (10 g de triptona, 5 g de extrato de levedura, 10 g de NaCl, 15 g de Ágar, água destilada q.s.p. 1L, pH 7,2)

adicionado de 100 ug/ml de canamicina, incubadas a 37°C por 12 h. As colônias recombinantes foram cultivadas em meio de cultura LB líquido com 100 µg/ml de canamicina, por 12 h a 37°C, sob agitação constante a 110 rpm e, então, submetidas a mini-preparação de DNA plasmidial segundo Sambrook & Russel (2001). As amostras foram analisadas, por eletroforese em gel de agarose 1%, e quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000.

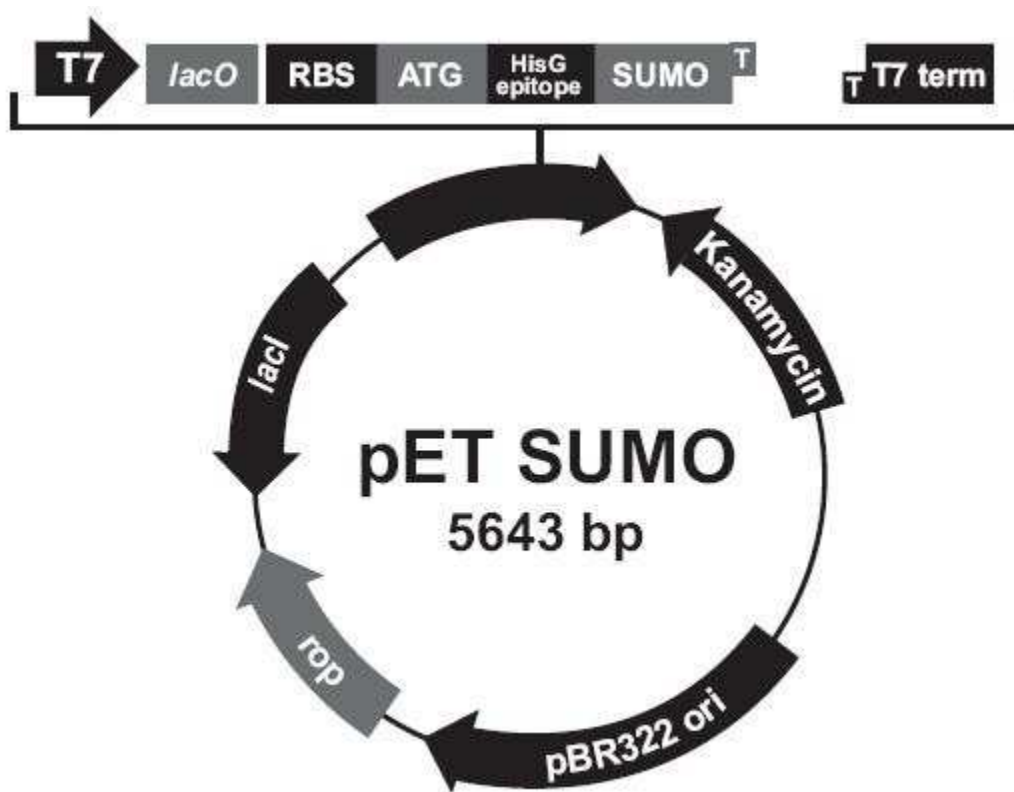


Figura 1: Mapa do vetor de clonagem e expressão pET SUMO (Invitrogen).

4.5. Determinação de orientação correta de clonagem do gene *vip3Aa*

As construções recombinantes foram analisadas de diversas maneiras. Primeiramente, todas elas foram submetidas a clivagem com a enzima de restrição *NdeI*. Essa enzima cliva o vetor recombinante em padrões específicos. Em seguida, o DNA das construções foi amplificado com os oligonucleotídeos iniciadores presentes no vetor pET-SUMO, segundo os fabricantes: SUMO Direto – (5' AGATTCTTGTACGACGGTATTAG 3') T7 Reverso - (5' TAGTTATTGCTCAGCGGTGG 3'), que flanqueiam o inserto e também com os oligonucleotídeos iniciadores do gene descritos na Tabela 1.

Ao final desta etapa foi possível selecionar somente as construções cujos insertos apresentavam os tamanhos esperados para o gene em questão (Figura 2).

4.6. Confirmação da fase correta de leitura

A fim de se confirmar, que a fase de leitura para tradução do gene estava correta, procedeu-se o sequenciamento de produtos de PCR com as seguintes combinações de oligonucleotídeos iniciadores: T7 (Direto) e Vip6 (Reverso); SUMO (Direto) e T7 (Reverso) e Vip5 (Direto) e Vip6 (Reverso) (Tabela 1 e Figura 2)

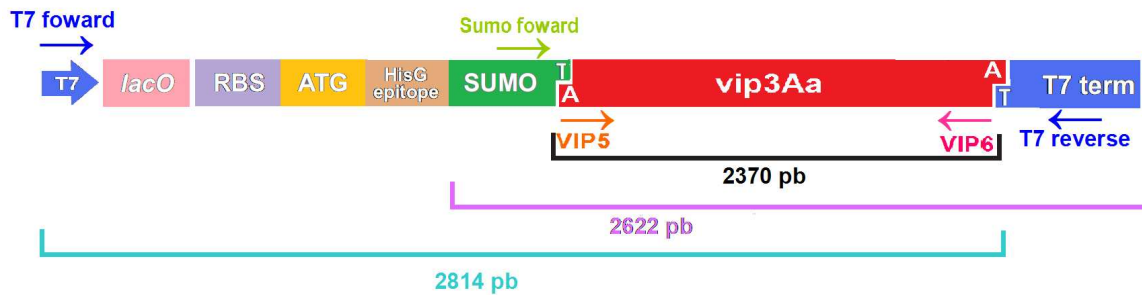


Figura 2: Esquema identificando os constituintes presente no vetor recombinante pET SUMO- *vip3Aa* e os tamanhos de pares de bases das combinações de oligonucleotídeos iniciadores: T7 direto e vip6 reverso (2814 pb); Sumo direto e T7 reverso (2622 pb); vip5 direto e vip6 reverso (2370 pb).

As reações de sequenciamento constaram de 4,0 µL de água bi-destilada estéril, 2,0 µL de tampão de sequenciamento, 2,0 µL de DYEnamic™ (GE Healthcare), 1,0 µL de DNA (~1500 ng) e 1,0 µL do respectivo oligonucleotídeo iniciador (5 pmoles). As reações foram submetidas à amplificação por meio do seguinte programa: 50 ciclos de 95 °C por 5 min, 95 °C por 30 s, 55 °C por 10 s e uma extensão final de 60 °C por 4 min.

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

Adicionou-se 10 µL de HiDi Formamida (*Applied Biosystems*) em cada amostra, estas foram desnaturadas em termociclador a 95°C por 5 min e imediatamente resfriadas em gelo para serem sequenciadas utilizando-se do analisador automático de DNA modelo 3100 *Genetic Analyzer* ABI, da empresa *Applied Biosystems*.

As sequências obtidas foram submetidas à análise com o programa Chromas Lite 2.01, para comprovar as construções com inserto na orientação correta, na fase de leitura correta e que não sofreram nenhuma mutação artificial (mudança na fase de leitura devido a erros da enzima no ato de amplificação a partir de DNA total) durante o processo de clonagem. A sequência FASTA resultante foi comparada com as depositadas nos bancos de dados de proteínas do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), através do algoritmo BLASTX da ferramenta BLAST.

4.7. Expressão da proteína Vip3Aa recombinante em *E. coli*

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

Inicialmente, as construções foram extraídas 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 contendo 160 ml de meio de cultura líquido LB 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, foi transferido para tubos de ensaio, previamente autoclavados, totalizando 12 tubos. Os quais foram submetidos a três temperaturas distintas de cultivo bacteriano (18, 25 e 37 °C), quatro concentrações diferentes do indutor de expressão IPTG (tiogalactopiranosídeo de isopropila) (0, 0,2, 0,4 e 1,0 mM) e três períodos de indução (4, 8, 12 h).

As células foram, então, coletadas por centrifugação a 7.400 x g por 30 min e lisadas por uma solução de lise do vetor pET SUMO contendo 20 mM de tampão fosfato, 0,5 M de NaCl, pH 7,4, 100 mg/ml de lisozima, 1mg/ml de DNase, incubando-se por 30 min com agitação de 100 rpm a 37°C. Em seguida, foram submetidas à

sonicação (Sonics Vibra Cell, Sonics & Materials, VCX 500), com “Duty Cycle 10%”, “Out put control 5” por 60 segundos com pausa de 10 s e mais 60 s de sonicação. Os sobrenadantes foram coletados após centrifugação a $7.400 \times g$ a 4°C por 20 min e utilizados para análise da proteína expressa e também para os bioensaios.

A confirmação da produção da proteína de interesse foi aferida por meio de resolução de proteínas totais em gel SDS-PAGE 10% conforme LAEMMLI (1970). A eletroforese descontínua em gel de poliacrilamida foi realizada utilizando mini-gel (60 x 80 x 1,0 mm) do sistema Mini-Protean II (Bio-Rad). O gel de separação foi preparado na concentração de 12% de poliacrilamida (acrilamida: bis-acrilamida 30: 0,8%) e 1% de SDS e de 5% de poliacrilamida para o gel de empilhamento e 0,5% SDS. A eletroforese foi realizada em tampão Tris-Glicina (50mM Tris, pH 8,6, 1,92 M glicina e 1% SDS), a 30 mA e 300V por até 80 min em temperatura ambiente.

Para amostra de 20 μl de proteína, foram adicionados 10 μl de tampão de amostra [Tris-HCl 0,187M, pH 7,0 SDS 2,0% (m/v), Azul de Bromo Fenol 1,0% (m/v), glicerol 27% (v/v)] e β -mercaptoetanol 5,0% (v/v). A mistura foi submetida por 2 min a 100°C e aplicadas no gel de SDS-PAGE 12%.

Após a eletroforese, as bandas polipeptídicas foram detectadas por meio da coloração do gel com Coomassie-Brilliant Blue R-250 0,1% (m/v), dissolvido em 50% de metanol e 10% de ácido acético, deixados sob baixa agitação por até 20 min. A descoloração do gel foi realizada com solução descolorante (10% de metanol e 10% de ácido acético) sob baixa agitação por no mínimo 1 h. Os géis foram conservados em água destilada até serem analisados e fotodocumentados.

4.8. Detecção da proteína Vip3Aa por Western Blotting

Para a realização da técnica de Western Blotting, o gel de SDS-PAGE, feito conforme descrito anteriormente e não corado, contendo as referidas amostras e o marcador “molecular Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder” (Fermentas) foi eletro-transferido em cuba de transferência úmida para uma membrana de nitrocelulose

HPVDF (Amersham Bioscience), utilizando-se de um tampão de transferência (50 mM de Tris; 384 mM de glicina e 20% (v/v) de metanol pH 8,3) sendo o processo realizado a 15 V por 35 min e a 4°C. Após a transferência, a eficiência da mesma foi verificada corando-se a membrana com 0,1% Ponceau S dissolvido em ácido acético 1% e fazendo-se, a seguir, a descoloração, com água destilada.

A membrana foi submetida ao bloqueio com 10 ml de tampão PBS (Salina tamponada com fosfato; 0,01 M tampão fosfato; 2,7 mM KCl₂; 137 mM NaCl; pH 7,4) contendo 5% de leite em pó desnatado (LPD) e 0,02% Tween-20, sob agitação suave por 1h. Em seguida foi colocada em uma solução contendo o anticorpo primário: anticorpo monoclonal IgG de camundongo anti poli-histidina (Sigma®) e PBS na proporção de 1:500, sob agitação suave por 1h, a temperatura ambiente.

Após lavagens com PBS, procedeu-se a reação com anticorpo secundário: conjugado imunoenzimático de peroxidase com o anticorpo de cabra anti-IgG de camundongo (Bethyl Laboratories Inc.), na diluição 1:500 em PBS-LPD 5%. Após a incubação por 1 h, a membrana foi novamente lavada com PBS e a reação de desenvolvimento da cor se processou com a mistura do cromógeno mais substrato específico (FAST DAB - Sigma®) contendo dietil-amino-etil-benzidina (0,7 mg) e peróxido de hidrogênio - uréia (1,6 mg).

Para interrupção da reação de degradação enzimática, a membrana foi lavada com água deionizada e, posteriormente, dessecada em temperatura ambiente e, ao final, guardada ao abrigo da luz (TOWBIN et al., 1979).

4.9. Purificação da Proteína Vip3Aa

No momento da purificação da proteína Vip3Aa, adicionou-se ao sobrenadante 2 M de imidazol (concentração final de 10 mM), centrifugando-se por 10 min a 14000 rpm a 4°C. Os sobrenadantes foram transferidos para outros tubos e uma alíquota do lisado retirada para a determinação de proteína por SDS/PAGE. Em seguida, o lisado foi submetido à coluna de purificação HiTrap Chelating HP – 1 ml (Amersham), carregada

com 0,1 M de NiSO_4 , devidamente preparada conforme instruções do fabricante. A proteína foi eluída com tampão de eluição (50 mM tampão fosfato, pH 8,0, 0,5 M NaCl e 500 mM de imidazol). As frações de 1,0 ml foram coletadas em tubos eppendorfs e, posteriormente, analisadas por eletroforese em gel de SDS/PAGE.

4.10. Indução da expressão e purificação da proteína Cry1Ia

Para obtenção da proteína Cry1Ia, cujo gene foi isolado e sequenciado por ESPINDOLA (2003), e clonado no vetor de expressão pET28a(+) por BERGAMASCO (2009), Uma única colônia de *E. coli* BL21(DE3), foi inoculada em uma pré-cultura contendo 20 ml de meio LB com 50 µg/ml de canamicina e cultivados com agitação de 250 rpm a 37°C, durante 16 h. Esse pré-inóculo foi transferido para 200 ml de meio LB com 50 µg/ml de canamicina até que a DO_{600} atingisse 0,025. Esta suspensão foi mantida sob agitação até atingir a de DO_{600} 1,2, sendo, então submetida a vários tratamentos a fim de se otimizar a expressão do gene *cry1Ia*. Estes consistiram de duas temperaturas distintas para o cultivo bacteriano (30 e 37 °C), três concentrações diferentes do indutor de expressão IPTG (0,5 mM, 1,0 mM e 5 mM) e quatro períodos de indução (12, 16, 18 e 24 h).

As células foram, então, coletadas e submetidas à solução de lise do vetor pET SUMO e, em seguida ao procedimento de sonicação, como descrito no item 4.8, a fim de se obter o lisado para posterior purificação e também para ser utilizado nos bioensaios.

O vetor pET28a(+) contém uma sequência de nucleotídeos que codifica uma 'cauda' de poli-histidina (6xHis), útil na detecção por Western Blotting e que pode ser utilizada na purificação da proteína por cromatografia de afinidade.

A verificação da expressão por gel SDS-PAGE, a confirmação da expressão da proteína Cry1Ia por Western Blotting e a purificação desta pela coluna HisTrap, seguiram as mesmas etapas descritas para a proteína Vip3Aa, nos itens 4.8 e 4.9.

4.11. Bioensaios com *Spodoptera frugiperda*

Os bioensaios foram conduzidos no Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA) do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária da FCAV/UNESP, Jaboticabal – SP. As lagartas de primeiro instar de *Spodoptera frugiperda* foram cedidas pelo Laboratório de Ecologia Aplicada do Departamento de Fitossanidade da FCAV – UNESP.

Para a realização dos bioensaios, foram utilizados os lisados dos clones de *E. coli* BL21 (DE3) contendo as proteínas Cry1Ia e Vip3Aa, separadamente, para determinação da atividade bioinseticida das proteínas.

4.12 – Bioensaios de Concentração Letal Média (CL₅₀) para proteínas Vip3Aa e Cry1Ia

Para os bioensaios com *S. frugiperda*, lagartas de primeiro instar foram alimentadas com dieta artificial como descrito por PRAÇA et al. (2004). Cinco diferentes concentrações (0,05; 0,5; 5; 50; 500 ng/cm²) a partir de uma solução estoque de 35 ng/ul da toxina Cry1Ia, e cinco diferentes concentrações (0,05; 5; 50; 500; 1000 ng/cm²) a partir de uma solução estoque de 77 ng/ul da toxina Vip3Aa foram testadas. Em ambos os casos, as proteínas foram devidamente quantificadas por densitometria (Bionumerics) (Applied-maths), utilizando-se de uma curva padrão de soroalbumina bovina (BSA). O mesmo procedimento foi realizado para as duas testemunhas, sendo que uma consistiu do lisado *E. coli* BL21 (DE3) contendo o vetor sem inserto do gene e a outra tampão de lise do vetor pET SUMO, utilizado para a diluição da toxina. Para cada concentração de toxina, 16 lagartas de primeiro instar foram utilizadas por repetição, totalizando 4 repetições por tratamento, com delineamento experimental inteiramente casualizado.

Um volume constante de 50 µl das diluições das amostras foi aplicado na superfície da dieta contida em placas de poliestireno de 128 poços (“Cell Wells, Corning Glass Works”, Corning, New York). Uma larva de primeiro instar foi adicionada por

poço. As placas foram incubadas a 28°C, com uma umidade relativa de $65 \pm 5\%$, e um fotoperíodo de 14 h: 10 h (luz: escuro).

Os tratamentos foram avaliados aos sete dias após a inoculação (POLANCZYK et al., 2000) e a seguir foi feita a quantificação de lagartas mortas pela ação do *B. thuringiensis*, cuja CL_{50} foi determinada pelo programa POLO-PC que realizou as análises probit dos resultados (ROBERTSON E PREISLER, 1992).

V . RESULTADOS

5.1. Amplificação, clonagem e expressão do gene *vip3Aa*

5.1.1. Clonagem e sequenciamento do gene *vip3Aa*

As amplificações do gene *Vip3Aa* com vistas à clonagem não apresentaram dificuldades. A partir do DNA total da linhagem de *B. thuringiensis* HD 125, obteve-se, após amplificação por PCR, um produto de aproximadamente 2.370 pb, conforme o esperado para o gene *vip3Aa* completo (Figura 3). Utilizou-se do par de iniciadores elaborados para esta finalidade (Tabela 1 e Figura 2). Sabe-se que este gene apresenta dois homólogos, o gene *vip3A(a)* (proteína Vip3Aa) acesso L48811, e o gene *vip3A(b)* (proteína Vip3Ab) acesso L48812, os quais foram isolados da linhagem *B. thuringiensis* HD 125 (LOGUERCIO et al., 2002).

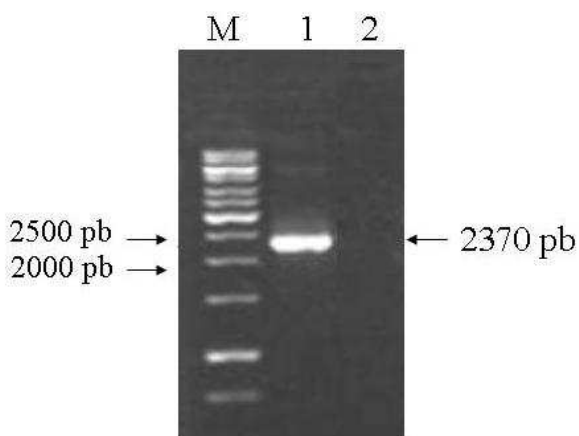


Figura 3. Eletroforograma evidenciando a amplificação do gene *vip3Aa* a partir do DNA total de *B. thuringiensis* HD-125. M: 1 Kb DNA Ladder (Fermentas); 1 – fragmento referente ao gene *vip3Aa* completo (2370 pb); 2 – Controle negativo da reação de PCR.

Após a ligação no vetor PET SUMO esse fragmento foi amplificado para transformação de células quimicamente competentes de *E. coli* BL21 (DE3). Desta transformação foram obtidos 29 transformantes que foram submetidos à análise plasmidial.

No vetor pET SUMO, a expressão do gene de interesse é controlada por um promotor bacteriófago T7 forte que foi modificado para conter um “*lac operator*”. Para a expressão do gene, é necessário o suprimento com T7 RNA polimerase para as células, que é fornecida pela *E. coli* BL21 (DE3) que, quando em quantidade suficiente, liga-se ao promotor T7 e transcreve o gene de interesse (STUDIER et al., 1990).

O vetor pET SUMO permite a clonagem e a expressão de uma proteína de interesse, fusionada à proteína SUMO, que incrementa a expressão da proteína recombinante e aumenta a solubilidade de proteínas parcialmente insolúveis, além de possuir uma cauda de histidina para facilitar a purificação da proteína de interesse. A proteína SUMO é originária da *Saccharomyces cerevisiae*, que faz parte da família da proteína “ubiquitina-like” responsável por regular vários processos celulares (MULLER et al., 2001).

A clivagem com a enzima *NdeI*, que lineariza o vetor, possibilitou verificar quais construções apresentavam o tamanho próximo ao esperado, que era de, aproximadamente, 8.000 pb (inserto+vetor). Verificou-se que 8 clones continham o tamanho esperado (Figura 4).

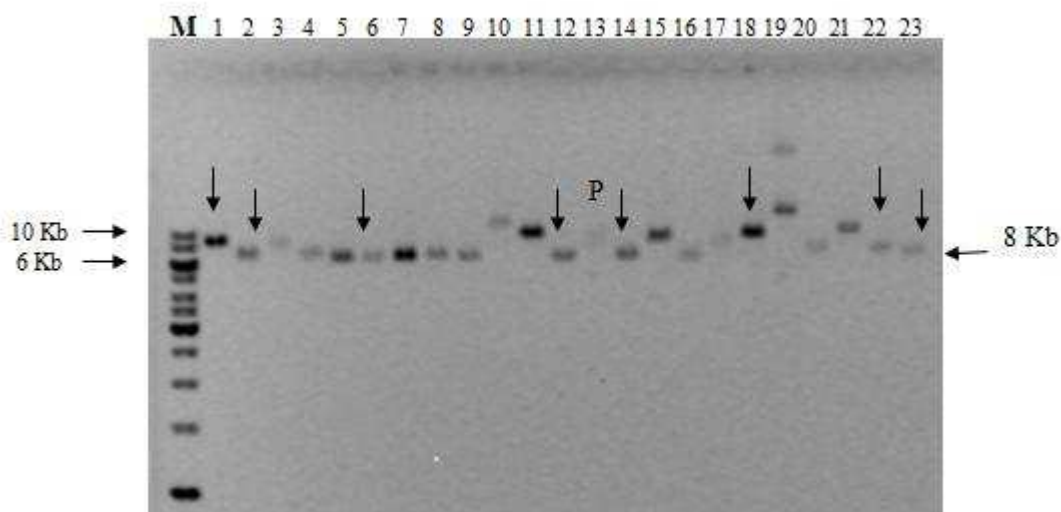


Figura 4. Eletroforograma evidenciando o padrão de restrição dos fragmentos obtidos após clivagem dos DNAs plasmidiais com enzima de restrição *NdeI*. **P:** Plasmídeo não clivado. **M:** 1 Kb DNA Ladder (Fermentas). As setas representam os colônias selecionadas (1,2,6,12,14, 18,22,23).

A fim de se comprovar os resultados, buscou-se outra estratégia: combinar oligonucleotídeos internos ao gene com os oligonucleotídeos iniciadores do vetor utilizando PCR com as seguintes combinações: T7 (Direto) e Vip6 (Reverso), SUMO (Direto) e T7 (Reverso) (Tabela 2), e Vip5 (Direto) e Vip6 (Reverso) (Tabela 1 e Figura 2). Os dois primeiros pares de iniciadores seriam para dirimir as dúvidas com ambos, quanto à orientação correta, uma vez que somente haveria amplificação se as sequências estivessem na orientação correta de clonagem, ou seja, “in frame” com o promotor do vetor.

Após as análises, verificou-se que os DNAs das colônias (1, 12, 14, 18, 22) apresentaram amplificações com os tamanhos esperado (Figura 2) para todas as combinações dos oligonucleotídeos utilizados (Figura 5).

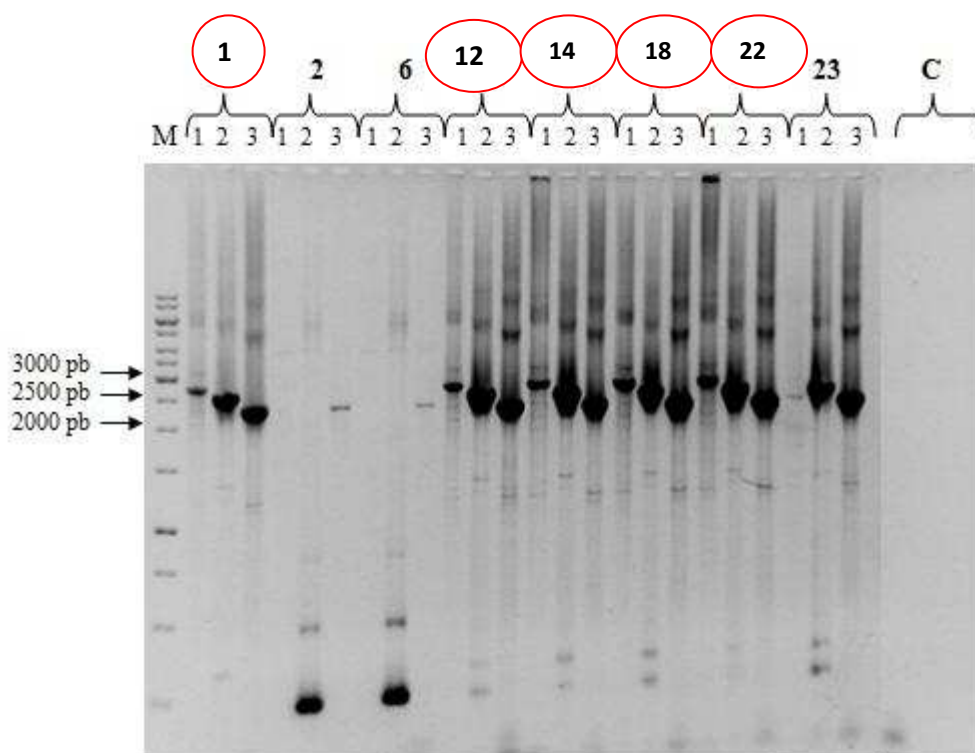


Figura 5. Eletroforograma evidenciando os produtos da PCR com combinação de iniciadores para a determinação dos clones com orientação correta de clonagem do gene *vip3Aa*. 1- T7 e Vip6, 2- SUMO e T7, 3- Vip5 e Vip6. Os números em destaque foram os transformantes selecionados (**1**, **12**, **14**, **18**, **22**) para novos testes de confirmação. **C**: Controle negativo sem a presença do DNA. M: 1 Kb DNA Ladder (Fermentas).

Após as análises, verificou-se que cinco construções apresentaram os produtos esperados para as combinações dos oligonucleotídeos (Figura 5). Assim sendo, optou-se por confirmar o sentido correto de leitura, ou seja, a presença do códon iniciador ATG, “in frame” ao promotor do vetor.

Foram selecionados 5 clones (1, 12, 14, 18, 22), visualizados na figura 5, dos quais foram extraídos DNA plasmidial e submetidos à, aproximadamente, 70 reações de sequenciamento com iniciadores T7 (Direto), Vip6 (Reverso), SUMO (Direto), T7

(Reverso), e Vip5 (Direto) (Tabela 1 e Figura 2). Sendo que ao final, foi possível verificar através do programa Chromas Lite 2.01, que o clone 14 apresentava o inserto na posição correta, evidenciando o códon de iniciação ATG “in frame” ao promotor presente no vetor de expressão pET-SUMO (Figura 6).

>Clone14

```

GTTAACGGAAGTCCGACGCANTACAATTCCCCTCCCGAAGTATCATTGTTTAACT
TTAAGAAGGAGATATACATATGGGCAGCAGCCAGCAACTGCATCATCACGGCAGC
GGCCGGGTGCCGTGCGGCAGCGCTAGCATGTCGGACTCAGAAGTCAATCAAGAAG
CTAAGCCAGAGGTCAAGCCAGAAGTCAAGCCTGAGATTACATCAATTTAAAGGT
GTCCGATGGATCTTCAGAGATCTTCTTCAAGATCAAAAAGACCACTCCTTTAAGA
AGGCTGATGGAAGCGTGTGCTAAAAGACAGGGTAAGGAAATGGACTCCTTAATAT
TCTTGTACGACGGGATTAGAATTCAAGCTGATCAGACCCCTGAAGATTTGGACAT
GGAGGATAACGATATTATTGAGGCTCACAGAGAACAGATTGGTGGTATGAACAAG
AATAATACTAAATTAAGCACAAAGAGCCTTACCAAGTTTTATTGATTATTTTAATG
GCATTTATGGATTTGCCACTGGTATCAAAGACATTATGAACATGATTTTTTAAAC
GGATACAGGTGGTGTATCTAACCTAGACGAAATTTTAAGAATCAGCAGTTACTAC
ATGATATTTCTGGTACATTGGATGGGGTGAATGGAAGCTTAATGATCTTATCGCA
CAGGGAACTTAATACAGAATTATCTAGGGAATATTAATAATTGCAAATGAACAAA
TCAGGTTTAATGATGTTAATAACAACCTCGATGCGATAATACGAGCTTCGGGTATA
TCTACTAAATTACTCTAGTTGAGTGAAGTATGAACAACATTATCGCTAGTCGGAA
TAGGATACTAGTAACCATGGAGAGAGTCCGAATAGTGGAATTATAAGGAAGGGTC
CTTTAACCACCCTACGGATTACCCTGGA

```

Figura 6. Sequência parcial de nucleotídeos gene *vip3Aa* do clone 14 de *E. coli* BL21(DE3). Em azul esta representada a sequência do vetor de clonagem pET-SUMO e em preto a sequência do gene *vip3Aa*. Em amarelo está destacada a sequência do oligonucleotídeo iniciador Vip5, que apresenta o códon ATG inicial do gene *vip3Aa* (metionina inicial).

5.1.2. Expressão e purificação da proteína Vip3Aa

Foram testados 3 temperaturas de multiplicação distintas, 4 concentrações do Indutor de 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 22 °C. O tamanho da proteína expressa é de aproximadamente, 88,5 KDa, esperado para proteínas Vip3A como verificado por (ESTRUCH et al., 1996; LOGUERCIO et al., 2002, SENA et al., 2009), mais 11 kDa da ubiquitina (SUMO) presente no vetor pET SUMO (Figura 1). O melhor resultado encontrado foi com a temperatura de multiplicação a 22 °C, a concentração de IPTG a 1,0 mM, com um período de multiplicação de 24 h, e uma rotação de 190 rpm, utilizando o tampão do vetor pET SUMO, composto por Imidazol. Sendo visualizado no gel de acrilamida à 12% (Figura 7).

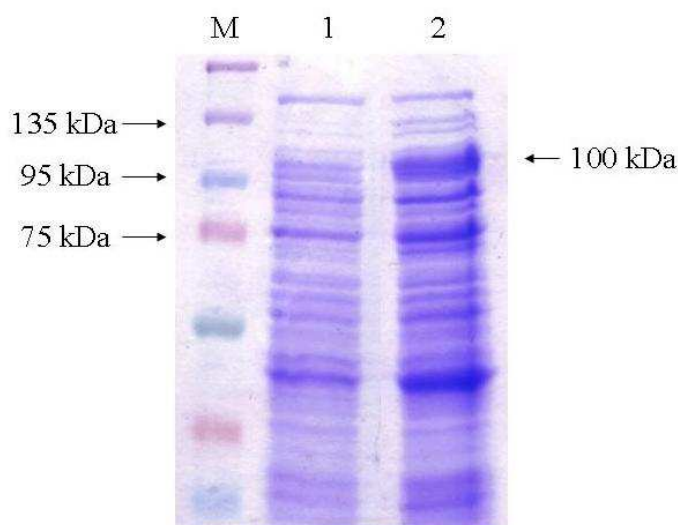


Figura 7. Detecção da proteína recombinante em gel de SDS-PAGE 10%. M: marcador molecular (kDa) “Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder” (Fermentas). 1. Lisado obtido de *E. coli* contendo o vetor sem o inserto. 2. Lisado obtido de células de *E. coli* recombinante contendo a proteína Vip3Aa, indicada pela seta.

Para confirmação de expressão da proteína, inicialmente a partir da construção, as frações foram transferidas para membrana de nitrocelulose e a técnica de Western Blotting foi realizada na tentativa de se detectar e confirmar a presença da proteína recombinante pela ligação do anticorpo anti-His à cauda de polihistidina da proteína. Podemos observar a banda correspondente à reação do anticorpo contra a proteína recombinante, ao passo que não houve nenhuma detecção com relação ao extrato preparado com células de *E. coli* sem o inserto (Figura 8).

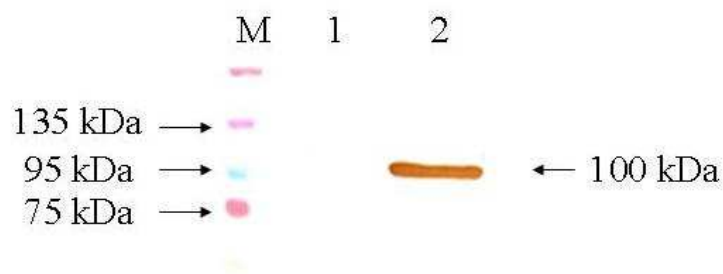


Figura 8. Detecção por Western blot da proteína Vip3A expressa em *E. coli*. **M:** marcador de peso molecular (KDa) de proteínas “Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder” (Fermentas). **1.** Lisado obtido de *E. coli* contendo o vetor sem o inserto. **2.** Lisado obtido do clone recombinante de *E. coli* evidenciando a proteína Vip3Aa, por meio da reação com anticorpo anti-His.

Seguindo a expressão, o lisado bacteriano induzido para a expressão da Vip3Aa foi purificado em colunas HisTrap HP, com tampão de equilíbrio com 20 mM de Imidazol e tampão de eluição a 500 mM de Imidazol. Nas primeiras purificações, as frações ficaram puras e foram quantificadas com o “software” Bionumerics. Nas purificações seguintes (Figura 9). Mesmo não tendo as frações somente com a proteína de interesse, as bandas referentes à proteína Vip3Aa, foram quantificadas por desintometria, para futuros experimentos com marcação da proteína purificada, visando ensaios de competição para BBMV.

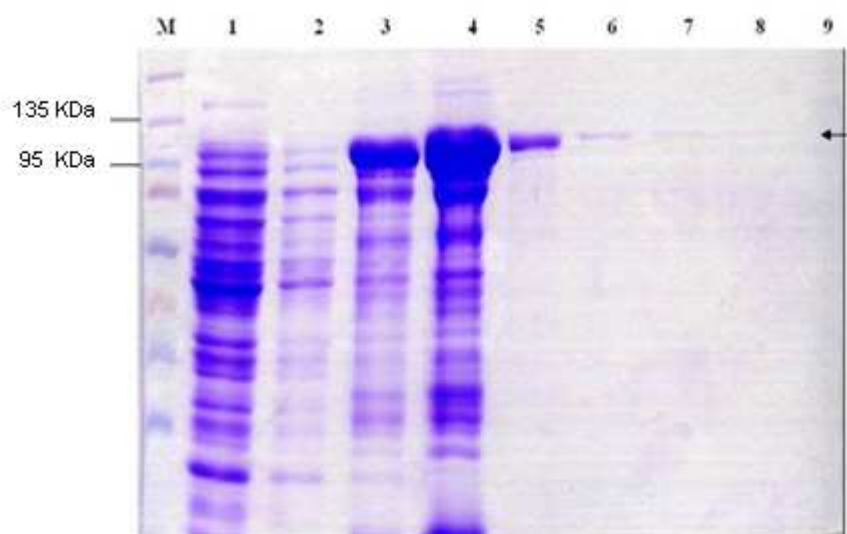


Figura 9. Detecção em gel de SDS PAGE 10% da proteína Vip3Aa purificada em colunas HisTrap HP (Amersham), carregada com níquel. Canaletas: M= Marcador molecular em KDa, Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Fermentas); 1= eluato obtido após passagem da proteína pela coluna; 2= eluato obtido após a passagem pela coluna com 500 mM de imidazol; 3= 1ª fração contendo a proteína eluída ; 4= 2ª fração contendo a proteína eluída ; 5= 3ª fração contendo a proteína eluída; 6,7,8 e 9= frações contendo as proteínas eluídas. Proteína Vip3Aa está indicada pela seta.

5.2. Expressão e purificação da proteína Cry1Ia

Para a expressão do gene *cry1Ia*, a partir de *E. coli* BL21 e purificação da proteína Cry1Ia, o melhor resultado foi obtido com a temperatura de multiplicação a 30°C, a concentração de IPTG a 5 mM, com um período de multiplicação de 24 h.

A análise pela técnica de SDS-PAGE demonstrou a presença de uma banda com peso molecular de aproximadamente 81 kDa, correspondente à proteína Cry1Ia,

juntamente com várias outras frações protéicas da própria *E. coli*, comparados a um extrato da *E. coli* contendo o vetor sem inserto do gene (Figura 10).

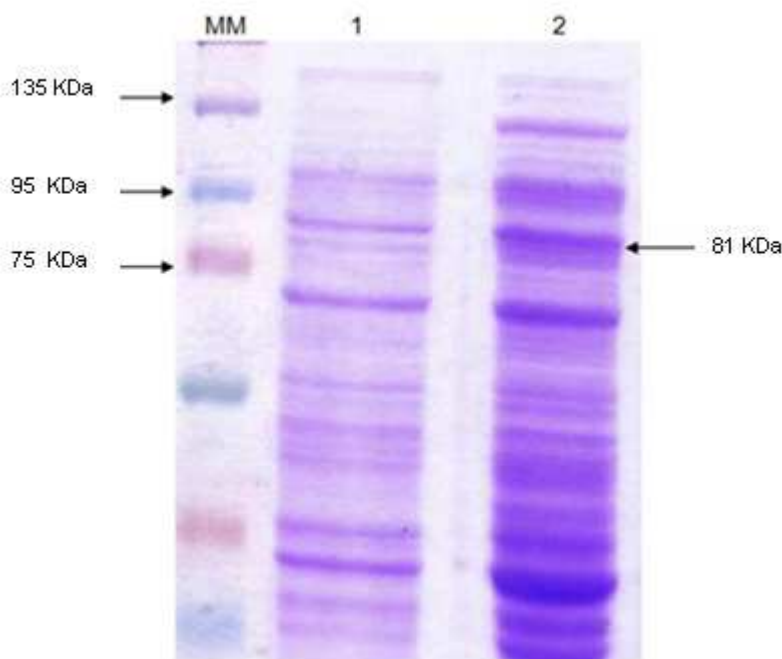


Figura 10. Detecção da proteína cry1Ia em gel de SDS PAGE 10%. Canaletas: M= Marcador molecular em KDa, Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Fermentas); 1= Proteínas do extrato de células de *E. coli* com vetor sem o inserto; 2= Proteínas do extrato de células do clone recombinante contendo a proteína Cry1Ia, indicada pela seta.

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

passo que não houve nenhuma detecção com relação ao extrato preparado com células de *E. coli* sem o inserto (Figura 11).

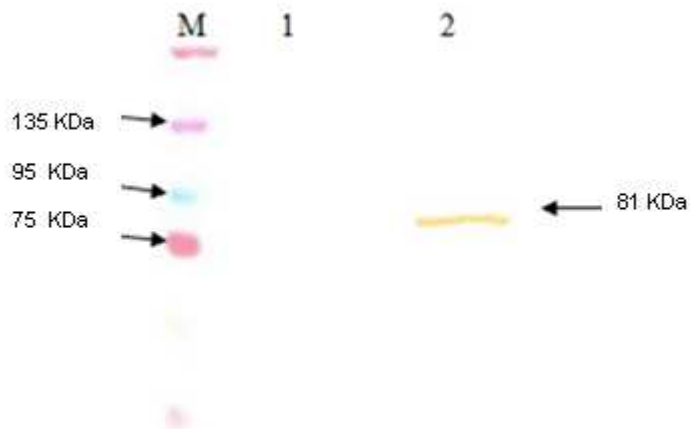


Figura 11. Detecção por Western Blotting da proteína Cry1Ia expressa em *E. coli*. Canaletas: M= Marcador molecular em kDa, Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Fermentas); 1= Extrato de proteína total de células de *E. coli* com vetor sem o inserto; 2= Extrato de proteína total do clone recombinante de *E. coli*, evidenciando a proteína Cry1Ia.

Seguindo a expressão, o lisado bacteriano induzido para a expressão da Cry1Ia foi purificado em colunas HisTrap HP (Figura 12), com tampão de equilíbrio com 20 mM de Imidazol e tampão de eluição a 500 mM de Imidazol. Na purificação (Figura 7), não houve completo êxito visto que as frações (Frações 1, 2 e 3) com maior concentração da proteína Cry1Ia contêm outras bandas de proteínas, indicando inespecificidade na ligação destas proteínas ao níquel da coluna. Mesmo não tendo as frações somente com a proteína de interesse, as bandas referentes à proteína Cry1Ia, foram quantificadas por desintometria, para futuros experimentos com marcação da proteína purificada, visando ensaios de competência para BBMV. Visando experimentos posteriores, como análises de ligação “in vitro” e “in vivo” das toxinas Cry1Ia e Vip3Aa, aos receptores do epitélio intestinal deste inseto, são ferramentas para demonstrar ou

não correlação entre ligação e toxicidade, bem como os tipos de interação que podem não resultar na evolução da resistência de *S. frugiperda*.

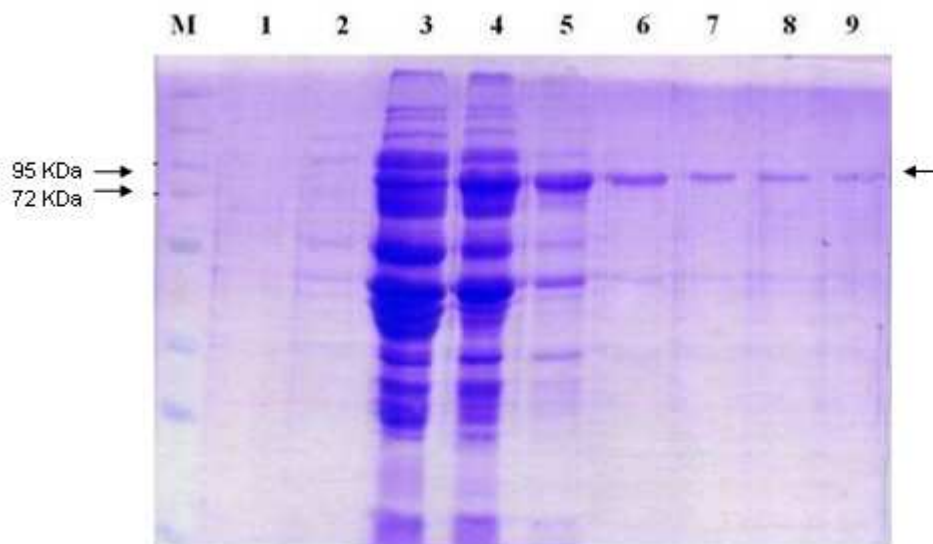


Figura 12. Detecção em gel de SDS PAGE 10% da proteína Cry1Ia purificada em colunas HisTrap HP (Amersham), carregada com níquel. Canaletas: M= Marcador molecular em KDa, Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Fermentas); 1= eluato obtido após a passagem da proteína pela coluna; 2= eluato obtido após a passagem com 500 mM de imidazol pela coluna; 3= 1ª fração contendo proteína eluida; 4= 2ª fração contendo proteína eluida; 5= 3ª fração contendo proteína eluida; 6,7,8 e 9= frações contendo as proteínas eluidas. Proteína Cry1Ia está indicada pela seta.

5.3. Bioensaios com *Spodoptera frugiperda*

Os bioensaios foram realizados com os lisados obtidos antes da purificação com a coluna HisTrap HP (Amersham).

Nos bioensaios com *S. frugiperda*, a CL_{50} dos lisados contendo as proteínas Cry1Ia e Vip3Aa foi aferida (Tabela 2), sendo que todos a CL_{50} para a proteína Cry1Ia de 69,52 ng/cm² e, para a proteína Vip3Aa, a CL_{50} foi de 24,66 ng/cm². A exposição das larvas ao lisado proveniente da *E. coli* BL21 (DE3), contendo o vetor sem inserto e ao tampão de lise do vetor pET SUMO, usados como controles negativos, não causou mortalidade. Esses dados demonstram claramente que as toxinas de *B. thuringiensis* Vip3Aa e Cry1Ia são ativas contra *S. frugiperda*.

Tabela 2. Bioensaios de dose/resposta das proteínas Cry1Ia e Vip3Aa com larvas de primeiro instar de *S. frugiperda*.

Toxinas	CL_{50} (ng/cm ²) (IC min.máx.) ¹	$b \pm (EP)^2$
Vip3Aa	24,66 (9,731 – 44,510)	1,233 $\pm$ 0,207
Cry1Ia	69,52 (30,235 – 140,130)	0,839 $\pm$ 0,167

(IC min.máx.)¹ : Intervalo de confiança (IC 95%); $b \pm (EP)^2$: Coeficiente angular da reta e Erro Padrão.

VI. DISCUSSÃO

A expressão de genes de vários microorganismos em *E. coli* tem sido largamente utilizada com sucesso e, o uso desta técnica no presente estudo, resultou na obtenção de clones *E. coli* portadores dos genes *vip3Aa* e *cry1Ia*. A toxicidade das proteínas codificadas foi testada frente à praga da ordem Lepidoptera, *S. frugiperda*, confirmando a ação efetiva das proteínas Vip3Aa e Cry1Ia, que se apresentaram altamente tóxicas à mesma. Esta estratégia possibilitou verificar que as proteínas recombinantes seguem com suas propriedades inseticidas, tais como nas linhagens de origem. Essa estratégia permite o estudo da eficiência das toxinas isoladamente visando principalmente a obtenção de plantas geneticamente modificadas portadoras de genes *Bt* no controle das diferentes pragas das culturas.

O sistema de expressão em *E. coli* permitiu, a obtenção das toxinas Vip3Aa e Cry1Ia, as quais foram analisadas por meio da técnica SDS-PAGE, tendo peso, aproximadamente de 100 KDa (Figura 7) e 81 KDa (Figura 10), para as toxinas Vip3Aa e Cry1Ia. O aumento do peso da proteína Cry1Ia deve-se à adição da cauda de poli-histidina, enquanto para proteína Vip3Aa a adição de 11 KDa, deve-se à ubiquitina (SUMO) presente no vetor pET SUMO. A técnica de Western Blotting (Figuras 8 e 11) confirmou a correta inserção dos genes *cry1Ia* e *vip3Aa* no vetor de expressão, e o reconhecimento da cauda de poli-histidina na fração das proteínas, resultando em bandas com os tamanhos previstos. Genes *cry* de *B. thuringiensis* vêm sendo isolados e clonados em *E. coli* ou em *B. thuringiensis* mutantes para genes *cry* (*cry⁻B*), por vários pesquisadores, já algum tempo (KUMAR et al., 2005; HERNANDEZ-MARTINEZ et al., 2008; BERGAMASCO, 2009) e, para genes *vip3* (LEE et al., 2003; BHALLA et al., 2005; SENA et al., 2009, ABDELKEFI-MESRATI et al., 2011) tidos como responsáveis pela expressão de proteína altamente tóxicas a um amplo espectro de insetos da ordem Lepidoptera.

Tanto as toxinas Cry1I, quanto as Vip3A são solúveis e não formam cristais protéicos, enquanto a maioria das toxinas Cry formam cristais protéicos. Toxinas Cry1I

apresentam uma gama de ação a insetos da ordem Lepidoptera e Coleoptera (SHIN et al., 1995; CHOI et al., 2000; SONG et al., 2003), propriedade também encontrada em outras proteínas como as Cry1B (ativa para lepidópteros, dípteros e coleópteros), Cry1Ac (ativa para lepidópteros) e Cry2A (ativa para lepidópteros e dípteros) (WINDER & WHITELEY, 1990; ZHONG et al., 2000). As toxinas Vip são produzidas durante o estágio de crescimento vegetativo e secretadas no sobrenadante da cultura por muitas estirpes de *B. thuringiensis*. Elas são tóxicas para certas espécies de coleópteros (Vip1 e Vip2) ou para uma gama de insetos lepidópteros (Vip3) (ESTRUCH et al., 1996; ESTRUCH et al., 1997; ESPINASSE et al., 2003).

Em experimentos realizados por LOGUERCIO et al. (2002), foi considerado o nível de 38,1% de mortalidade como moderadamente tóxico para *S. frugiperda*, tendo em vista que os bioensaios foram realizados com sobrenadante de *B. thuringiensis*, contendo Vip3A, no entanto a proteína não foi isolada. A eficiência é elevada quando a proteína Vip3A é expressa em *E. coli* e a bactéria recombinante é usada em bioensaios, chegando a 100% de mortalidade. Os resultados obtidos neste trabalho, evidenciam a eficiência da proteína Vip3Aa, presente no lisado da proteína, contra lagartas neonatas de *S. frugiperda* onde verificou-se uma taxa de mortalidade de 96,8% e uma CL_{50} de 24,66 ng/cm². Além de *S. frugiperda* as primeiras proteínas desta classe relatadas (Vip3Aa e Vip3Ab) quando expressa em *E. coli* exibiram elevado índice de mortalidade (100%) também para *Agrotis ipsilon* e *Spodoptera exigua*. (ESTRUCH et al., 1996; LOGUERCIO et al., 2002).

RANG et al. (2005) observaram que a nova proteína Vip3Ba1 foi expressa em estirpe de *E. coli* recombinante e não causou mortalidade em *O. nubilalis* e *P. xylostella*, apenas redução de crescimento das larvas impedindo a mudança de instar. MILNE et al. (2008) mostraram que os lepidópteros *Choristoneura fumiferana* e *Lymantria dispar* são menos suscetíveis a Vip3Aa do que *S. exigua* (10 e ~ 100 vezes, respectivamente). Para estas espécies, a diferença na suscetibilidade foi mostrado por bioensaios usando inibição de crescimento como resposta à dose, e não mortalidade. Estes autores consideram como altamente suscetíveis as espécies de *S. exigua* e *A. ipsilon*, e menos suscetíveis as espécies de *Tricoplusia ni*, *H. virescens*, *C. fumiferana* e *L. dispar*.

No bioensaio realizado, Vip3Aa foi altamente tóxica à *S. frugiperda* (CL_{50} 24,66 ng/cm²), com 95% de intervalo de confiança (9,731 – 44,510 ng/cm²), os resultados foram obtidos com um *slope* de $1,233 \pm 0,207$ (Tabela 2), estando abaixo dos valores encontrados no banco de dados “Specificity Database” (<http://www.glfrc.forestry.ca/bacillus>), o qual aponta os valor de 55,9 ng/cm² para larvas neonatas de *S. frugiperda*, com deposição da toxina na superfície da dieta (LEE et al., 2003). SENA et al. (2009) testaram a toxicidade e a interação de ligação das proteínas Vip3Aa, Vip3Af, Cry1Ab e Cry1Fa em *S. frugiperda* e a toxicidade das mesmas foram de 49,3 ng/cm² para Vip3Aa, de 21 ng/cm² para Vip3Af, de 867 ng/cm² para Cry1Ab e de 170 ng/cm² para Cry1Fa. Demonstraram que as proteínas Vip3A foram mais tóxicas que as proteínas Cry1 e que as proteínas Vip3A e Cry1 estudadas tem sítios de ligação independentes nos receptores intestinais deste inseto, ocorrendo competição pelo mesmo sítio entre as proteínas Cry1Ab e Cry1Fa, assim como Vip3Aa compete pelo mesmo sítio que Vip3Af.

Existem outras proteínas recombinantes com efeito tóxico à diferentes larvas neonatas de diferentes espécies de insetos da ordem Lepidóptera, como a toxina Vip3A-S184, clonada e expressa em *E. coli* BL21 que demonstrou em bioensaio alta toxicidade com CL_{50} de 0,16 µg/ml contra *Helicoverpa armigera*, enquanto para *S. litura* a CL_{50} de 0,27 µg/ml, mantendo o mesmo nível da *H. armigera*, entretanto esta proteína teve baixo nível de toxicidade para *S. exigua* com CL_{50} de 0,74 µg/ml (CHEN et al., 2003).

No trabalho de DOSS et al. (2002), a proteína Vip3Aa1 foi expressa em *E. coli* BL21 (DE3), e sua toxicidade foi demonstrada contra larva de *Agrotis ipsilon*, causando 50% de mortalidade a uma concentração de 80 ng/cm², enquanto para *S. litura* e *Plutella xylostella*, são 45 ng/cm² e 220 ng/cm², respectivamente, para Vip3Aa1.

A toxicidade da proteína Vip3Aa16 foi testada contra larvas de primeiro ínstar de *S. littoralis*, com uma CL_{50} de 305 ng/cm² com intervalo de confiança a 95% (211-400 ng/cm²) e CL_{90} de 1045 ng/cm² com 95% de intervalo de confiança (729-1360 ng/cm²), demonstrando sua eficiência no controle desta praga (ABDELKEFI-MESRATI et al., 2011). No caso da *A. ipsilon*, a proteína Vip3A proporciona 260 vezes atividade

inseticida superior que algumas proteínas Cry1A relatadas como sendo ativas contra esta praga (ESTRUCH et al., 1996).

As diferenças nos valores das doses de CL_{50} para mesma espécie de insetos, obtidas nos trabalhos podem estar relacionadas a diferentes populações de *S. frugiperda* utilizadas. Enquanto que as diferentes atividades das proteínas Vip3 podem ser devidas as alterações nos aminoácidos, ou a outros fatores como a sensibilidade dos insetos geograficamente distintos, e ainda diferença nos estágios larvais utilizados para ensaios de toxicidade (DOSS, et al., 2002).

Neste trabalho, a CL_{50} para *S. frugiperda* da proteína recombinante Cry1Ia foi de 69,52 ng/cm², com 95% de intervalo de confiança (30,235 – 140,130 ng/cm²), os resultados foram obtidos com um *slope* de $0,839 \pm 0,167$ (Tabela 2), mostrando toxicidade a esta praga. BERGAMASCO (2009) também testou a toxina Cry1Ia contra *S. frugiperda*, utilizando o lisado contendo a proteína Cry1Ia expressa em *E. coli* e obteve uma CL_{50} de 0,002 µg/ml. Nos estudos de LI-MING et al. (2007), a proteína Cry1Ia expressa em *E. coli* BL21 foi utilizada em bioensaios e sua CL_{50} foi determinada para *Ostrinia fumacalis* e *P. xylostella*, com os valores de 0,268 µg/ml e 2,227 µg/ml, respectivamente, verificando isoladamente a sua toxicidade à praga utilizada.

A proteína recombinante Cry1Ia12 expressa em *E. coli*, mostrou toxicidade frente a larvas de primeiro instar de *A. grandis* e *S. frugiperda*, sendo a CL_{50} de 230 µg/ml e 5 µg/ml, respectivamente (GROSSI-DE-SÁ et al., 2007).

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

ESCUADERO et al. (2006), isolou um novo gene *cry1I*, denominado de *cry1Ia7* e sua proteína foi expressa em *E. coli*. Esta proteína foi solúvel em água e apresentou-se

tóxica a várias espécies de insetos. Ensaio de união foram realizados com a toxina Cry1Ia7 biotinilada e demonstraram que esta não ocupa o mesmo sítio de união das toxinas Cry1Ab ou Cry1Ac no intestino de *Earias insulana* e *Lobesia botrana*, as quais são comumente encontradas em culturas *Bt* e em bioinseticidas comerciais baseados em *B. thuringiensis*. Estas proteínas podem estar presentes em plantas *Bt* piramidadas, com estas e outras proteínas, visando ao manejo da resistência.

A expressão em *E. coli* da proteína Cry1Ia e Vip3Aa produz corpos de inclusão quando são expressos nesta bactéria, o que não ocorre em *B. thuringiensis*, devido ao fato de estas proteínas serem secretadas no meio de cultura, impedindo o seu uso em aplicações de bioinseticidas (ESCUDEIRO et al., 2006). Contudo, suas características inseticidas podem ser exploradas com sucesso se as proteínas forem expressas em plantas transgênicas (LIU et al., 2004).

Várias áreas de pesquisa vêm estudando estratégias que selecionem formas resistentes de plantas a insetos. Na área molecular, as toxinas microbianas inseto-específicas são uma alternativa. Um dos organismos mais estudados e utilizados é o *B. thuringiensis*. Com isso, uma mesma planta poderia expressar diferentes genes, ou um único gene que codifique uma proteína com dupla atividade.

Com o advento da biotecnologia moderna, genes que codificam proteínas com propriedades inseticidas, foram isolados de *B. thuringiensis* e modificados para expressarem adequadamente em plantas, para o controle de pragas alvo em diversas culturas. As Vip3Aa e Cry1Ia são proteínas potencialmente importantes para melhor preservar o uso destes agentes de controle de insetos, podendo ser utilizadas em estratégias que envolvam a apresentação de várias toxinas juntas, especialmente se tiverem um modo de ação diferente. Isto pode ser obtido pela construção de plantas piramidadas de milho, com mais de um transgene de *B. thuringiensis*, diminuindo as chances do inseto se tornar resistente, o que tem sido em alguns casos relatado para os transgênicos com único gene *cry*. Portanto, Vip3Aa e Cry1Ia, seria interessante realizar ensaios de competência com ambas as toxinas e BBMV de *S. frugiperda*, para verificar se existem sítios diferentes de união ao intestino, isso indicaria a possibilidade

de se fazer uma planta de milho *Bt*, piramidada, para qual *S. frugiperda* não ofereceria resistência.

VII. CONCLUSÕES

- Os processos de isolamento, clonagem e expressão em sistema bacteriano da *Escherichia coli* BL21 (DE3) foram efetivos para a obtenção das proteínas Cry1Ia e Vip3Aa funcionais.
- As proteínas Cry1Ia e Vip3Aa recombinantes demonstraram alta toxicidade às lagartas de primeiro instar de *S. frugiperda*, revelando um grande potencial para o controle desta praga, isso é uma indicação importante para produção de plantas transgênicas de milho.

VIII. REFERÊNCIAS

ABDELKEFI-MESRATI, L.; BOUKEDI, H., DAMMAK-KARRAY, M.; SELLAMI-BOUDAWARA, T.; JAOUA, S.; TOUNSI, S. Study of the *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa16 histopathological effects and determination of its putative binding proteins in the midgut of *Spodoptera littoralis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v2, p.250-254, 2011.

ARANDA, E., SANCHEZ, J., PEFFEROEN, M., GÜERECA L.; BRAVO, A. Interactions of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins with the midgut epithelial cells of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.68, p.203-212, 1996.

ARORA, N. et al. Relocating expression of vegetative insecticidal protein into mother cell of *Bacillus thuringiensis*. **Biochemical Biophysical Research Communications**. v. 310, p. 158-162, 2003.

AZOL, M.S. **Detecção de Polimorfismo por PCR-RFLP no gene *vip3A* em Isolados de *Bacillus thuringiensis* e Avaliação da proteína Vip3A no controle de *Spodoptera frugiperda***. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas)- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, 2006.

BERGAMASCO, V. B. **Identificação de genes *cry1* em isolados de *Bacillus thuringiensis* e expressão do gene *cry1la* em *Escherichia coli* visando o controle de pragas da cultura algodoeira**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária – Universidade estadual paulista. Jaboticabal - SP, 2009.

BHALLA, R., et al. Isolation, characterization and expression of a novel vegetative insecticidal protein gene of *Bacillus thuringiensis*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 243, p. 467-472, 2005.

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. **Ciência Rural**, v. 34, 843-850, 2003.

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.

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.

CHEN, J.; YU, J.; TANG, L.; TANG, M.; SHI, Y.; PANG, Y. Comparison of the expression of *Bacillus thuringiensis* fulllength and N-terminally truncated vip3A gene in *Escherichia coli*. **Journal of Applied Microbiology**, v95, p.310–316, 2003.

CHOI, S. K., Shin, B. S., Kong, E. M., Rho, H. M. and Park, S. H. Cloning of a new *Bacillus thuringiensis* Cry1I-type crystal protein. **Current Microbiol.** v. 41, p. 65-69, 2000.

COELHO, A.M.; CRUZ, J.C.; PEREIRA FILHO, I.A. Desafios para a obtenção de altas produtividades de milho. **Comunicado Técnico**, 99, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Sete Lagoas – MG, 20p. 2004.

CRICKMORE, N. *Bacillus thuringiensis*: toxin nomenclature. Disponível em: < http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_crickmore/Bt/ >. Acesso em: 2008.

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D.R.; SCHENEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; BRAVO, A.; DEAN, D.H.. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. Disponível em: < http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_crickmore/Bt/index>. Acesso em: 2000.

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D.R.; FEITELSON J.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; DEAN, D.H.. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. **Microbiology Molecular Biology Reviews**. v.62, p.807-813, 1998.

DIAS, D.G.S. et al. Prospecção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra mosquitos. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento Embrapa**, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia Brasília D.F., n. 30, 26p., 2002.

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

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

ESCUDERO, I. R., ESTELA, A., PORCAR, M., MARTÍNEZ, C., OGUIZA, J. A., ESCRICHE, B., FERRÉ, J., CABALLERO, P. Molecular and Insecticidal Characterization of a Cry1I Protein Toxic to Insects of the Families Noctuidae, Tortricidae, Plutellidae, and Chrysomelidae. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 4796–4804, 2006.

ESPINASSE, S.; CHAUFAX, J.; BUISSON, C.; PERCHAT, S.; GOHAR, M.; BOURGUET, D.; SANCHIS, V. Occurrence and Linkage Between Secreted Insecticidal Toxins in Natural Isolates of *Bacillus thuringiensis*. **Current Microbiology**, New York, v. 47, p. 501 – 507, 2003.

ESPINDOLA, R. **Sequência completa do gene cry1la do isolado T01 328 de *Bacillus thuringiensis* provenientes do solo de Cubatão (SP-Brasil)**. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária – Universidade estadual paulista. Jaboticabal - SP, 2003.

ESTADA, U.; FERRÉ, J. Binding of insecticidal crystal proteins of *B.t.* to the midgut Brush border of the cabbage looper, *Tricoplusia ni* (Hübner) (Lepidoptera; noctuidae) and selection for resistance to one of the crystal proteins. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 3840-3846, 1994.

ESTRUCH, J. J.; CAROZZI, N. B.; DESAI, N.; DUCK, N. B.; WARREN, G. W.; KOZIEL, M. G. Transgenic plants: An emerging approach to pest control. **Nature Biotechnology**, New York, v. 15, n. 2, p. 137 – 141, 1997.

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

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 Protection Bulletin**, v. 13, p. 156 – 161, 1971.

FEITELSON, J. S.; PAYNE, J.; KIM, L. *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. **Bio/Technology**, New York, v. 10, p. 271-275, 1993.

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

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 (Lepidopetera: Pyralidae): Evidence of shared binding sites. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 5, p. 1544 – 1549, 1996.

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

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

GROSSI-DE-SÁ, M. F.; MAGALHÃES, M. Q.; SILVA, M. S.; BUFFON, S. M.; DIAS, S. C.; NAKASU, E. Y. T.; BRUNETTA, P. S. F.; OLIVEIRA, G. R. Susceptibility of *Anthonomus grandis* (Cotton Boll Weevil) and *Spodoptera frugiperda* (Fall Armyworm) to a Cry1Ia-type Toxin from a Brazilian *Bacillus thuringiensis* Strain. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 40, n. 5, p. 773-782, 2007.

HAIDER, M. Z.; KNOWLES, B. H; ELLAR, D. J. Specificity of *Bacillus thuringiensis* var. *colmeri* insecticidal delta- endotoxin is determined by differential proteolytic processing of the protoxin by larval gut proteases. **European Journal of Biochemistry**. v.156, p.531-540, 1986.

HAWTHORNE, D. Predicting pest evolution predicting insect adaptation to a resistant crop. **Journal Economic Entomology**. v.91, p.565-571, 1998.

HERNANDEZ-MARTINEZ, P.; FERRÉ, J.; ESCRICHE, B. Susceptibility of *Spodoptera exigua* to 9 toxins from *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Invertebrate Pathology**. New York, v. 97, p. 245 – 250, 2008.

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

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

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

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

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

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

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-MING, D; LAN-LAN, H.; JIEL, Z.; KANG-LAIL, H.; KUI-ZUN, Z. Cloning, expression and activity of cry1Ia gene from *Bacillus thuringiensis* isolate. **Journal of Agricultural Biotechnology**, v.15, p. 1053 – 1057, 2007.

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

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

LUO, K.; BANKS, D.; ADANG, M.J. Toxicity, binding, and permeability analyses of four *Bacillus thuringiensis* Cry1 δ -endotoxins using brush border membrane vesicles of *Spodoptera exigua* and *Spodoptera frugiperda*. **Applied and Environmental Microbiology**. v.65, p.457-464, 1999.

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

MARMUR, J. A. Procedure for isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. **Journal Molecular Biology.** v.3, 208-218, 1961.

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

MARTINS, E. S.; AGUIAR, R. W. D. S.; MARTINS, N. F.; MELATTI, V. M.; FALCÃO, R.; GOMES, A. C. M.; RIBEIRO, B. M.; MONNERAT, R. G. Recombinant Cry1Ia protein is highly toxic to cotton boll weevil (*Anthonomus grandis* Boheman) and fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*). **Journal Applied Microbiology.** Oxford, v. 104, p. 1363-1371, 2008.

MATTEN, S. R., HEAD, G. P., QUEMADA, H. D. How governmental regulation can help or hinder the integration of *Bt* crops into IPM programs. **Integration of Insect-Resistant Genetically Modified Crops within IPM Programs Progress in Biological Control.** v. 5, p. 27-39, 2008.

MILNE, R.; LIU, Y.; GAUTHIER, D.; VAN FRANKENHUYZEN, K. Purification of Vip3Aa from *Bacillus thuringiensis* HD-1 and its contribution to toxicity of Hd-1 to spruce budworm (*Choristoneura fumiferana*) and gypsy moth (*Lymantria dispar*) (Lepdoptera). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 99, n. 2, p. 166 – 172, 2008.

MOAR, W. J.; PUSZTAI-CAREY, M.; VAN FAASSEN, H.; BOSCH, D.; FRUTOS, R.; RANG, C.; LUO, K.; ADANG, M. J. Development of *Bacillus thuringiensis* CryIC resistance by *Spodoptera exigua* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae). **Applied And Environmental Microbiology**. v.61, p. 2086-2092, 1995.

MONNERAT, R.G.; BATISTA, A. C.; DE MEDEIROS, P.T. Screening of Brazilian *Bacillus thuringiensis* isolates active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatilis*. **Biological Control**, v.41, p. 291-295, 2007.

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

MÜLLER-COHN, J.; CHAUFAUX, J.; BUISSON, C.; et al. *Spodoptera litoralis* Boisduval (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to CryIc and cross – resistance to other *B.t.* crystal toxins. **Journal of Economic Entomology**, v. 89, p. 791-797, 1996.

MULLER, S.; HOEGE, C.; PYROWOLAKIS, G.; JENTSCH, S. SUMO, Ubiquitin's Mysterious Cousin. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v2, p.202-210, 2001.

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. 2007.

PFEIFER, T. A.; GRIGEIATTI, T. A. Future perspectives on insect pest management: engineering the pest. **Journal of Invertebrate Pathology** , v.67, p.109-119, 1996.

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.

POLANCZYK, R.A.; SILVA, R.F.P.; FIUZA, L.M. Effectiveness of *Bacillus thuringiensis* strains against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Brazilian Journal of Microbiology**, v.31, p.165-167, 2000.

PRAÇA, L.B.; BATISTA, A.C.; MARTINS, E.S.; SIQUEIRA, C.B.; DIAS, D.G.D.; GOMES, A.C.M.M.; FALCAO, R.; MONNERAT, R.G. *Bacillus thuringiensis* strains effective against insects of Lepidoptera, Coleoptera and Diptera orders. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, n. 1, 2004.

RANG, C.; BERGVINGSON, D.; BOHOROVA, N.; HOISINGTON, D.; FRUTOS, R. Competition of *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxins for midgut binding sites: A basis for the development and management of transgenic tropical maize resistant to several stemborers. **Current Microbiology**. v.49, p.22-27, 2004.

RANG, C.; GIL, P.; NEISNER, N.; VAN RIE, J.; FRUTOS, R. Novel Vip3-Related Protein from *Bacillus thuringiensis*. **Applied And Environmental Microbiology**, Washington, US, v. 71. n.10, p. 6276 – 6281, 2005.

ROBERTSON, J.L.; PREISLER, H. **Pesticide bioassays with arthropods**. CRC Press, Boca Raton, Fla., 1992.

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

SAS Institute. **SAS/STAT user's guide, release 9.1 ed.** SAS Institute, Cary, NC, 2004.

SENA, J. A. D.; HERNANDEZ-RODRIGUES, C. S.; FERRE, J.; Interaction of *Bacillus thuringiensis* Cry1 and Vip3A Proteins with *Spodoptera frugiperda* Midgut Binding Sites. **Applied And Environmental Microbiology**, v.75, p. 2236–2237, 2009.

SHIN, B. S., PARK, S. H., CHOI, S. K., KOO, B. T., LEE, S. T., KIM, J. I. Distribution of *cryV*-type insecticidal protein genes in *Bacillus thuringiensis* and cloning of *cryV*-type genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and *Bacillus thuringiensis* subsp. *entomocidus*. **Applied And Environmental Microbiology**. v. 61, p. 2402– 2407, 1995.

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

SOARES, S. Pragas do milho: da identificação ao tratamento. **Produs**, Belo Horizonte, n.51, p.59-63, 2010.

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

SONG, F. P., ZHANG, J., GU, A. X., WU, Y., HAN, L. L., HE, K. L., CHEN, Z. Y., YAO, J., HU, Y. Q., LI, G. X., HUANG, D. F. Identification of *cry1I*-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains and characterization of a novel *cry1I*-type gene. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 69, p. 5207-5211, 2003.

SPECIFICITY DATABASE. Disponível em: < <http://www.glfsc.forestry.ca/bacillus> >. Acesso em: 3 de Março de 2011.

STUDIER, F.W.; ROSENBERG, A. H.; DUNN, J. J.; DUBENDORFF, J. W. Use of T7 RNA Polymerase to Direct Expression of Cloned Genes. **Methods in Enzymology**, v185, 60-89. 1990.

SYNGENTA. Vip3A Cotton Transformation Event COT102. **Biotechnology Notification File**. 2005.

TAILOR, R. J., 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. **Molecular Microbiology**, v. 6, n. 9, p. 1211-1217. 1992.

TOUNSI, S.; JAOUA, S. Identification of a promotor for the cristal protein-encoding gene cry1Ia from *Bacillus thuringiensis* subs. kurstaki. **FEMS Microbiology Lettes**, v. 208, p.215-218, 2003.

TOWBIN, H.T., STAETHETIN.A., GORDON, J. Eletroforetic transfer of protein from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: Produce abd some applications. **Proc. Nati. Acad. Sci.**, U.S.A., Washington, v. 76, p. 4350-4354, 1979.

VALADARES-INGLIS, M. C. C.; SHILER, W.; SOUZA, M. T. de. Engenharia genética de microorganismos agentes de controle biológico. InL MELO, I.S.,; AZEVEDO, J.L. (Ed.) **Contole Biológico**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, v.1, p.201-230, 1998.

VAN FRANKENHUYZEN, K. The challenge of *Bacillus thuringiensis*. **Bacillus thuringiensis, an Environmental Biopesticide: Theory and Practice** (Ed. by P F Entwistle, S Cory, M J Bailey & Higgs), pp. 1-23. Wiley, Chichester, UK, 1993.

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

WIDNER, W.R.; WHITELEY, H.R. Location of the dipteran specificity region in a lepidopteran-dipteran crystal protein from *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Bacteriology**. Washington, v. 172, p. 2826–2832, 1990.

YAMAMOTO, T.; DEAN, D. H. Insecticidal proteins produced by bacteria pathogenic to agriculturas pests. In: CHARLES, J. F. et al. (Ed.). **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application**. Ottawa: Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 81 – 100.

YU, C. G.; MULLINS, M. A.; WARREN, G. W.; KOZIEL, M. G.; ESTRUCH, J. J. The *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A lyses midgut ephitelium cells of susceptible insects. **Applied and Environmental Microbiology**. v.63, p.532-536, 1997.

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