

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

**CARACTERIZAÇÃO DO GENE *chi*_I555 E PROPRIEDADES
BIOQUÍMICAS DA QUITINASE DE *Bacillus thuringiensis***

Maria Laura Viola Augusto

Bióloga

2014

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

**CARACTERIZAÇÃO DO GENE *chi_I555* E PROPRIEDADES
BIOQUÍMICAS DA QUITINASE DE *Bacillus thuringiensis***

Maria Laura Viola Augusto

**Orientador: Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério
Co-orientador: Prof. Dr. Guilherme Duarte Rossi**

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).

2014

Augusto, Maria Laura Viola
A923c Caracterização do gene *chi_I555* e propriedades bioquímicas da
quitinase de *Bacillus thuringiensis*/ Maria Laura Viola Augusto. – –
Jaboticabal, 2014
x, 39 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2014
Orientadora: Janete Aparecida Desidério
Banca examinadora: Agda Paula Facincani, Ana Maria Guidelli
Thuler
Bibliografia

1. Atividade quitinolítica. 2. *Bacillus thuringiensis*. 3. Fatores de
virulência. 4. Quitinase. 5. Toxinas inseticidas. I. Título. II. Jaboticabal-
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 631.528.1

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



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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: CARACTERIZAÇÃO DO GENE *chi_1555* E PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS DA QUITINASE DE *Bacillus thuringiensis*

AUTORA: MARIA LAURA VIOLA AUGUSTO

ORIENTADORA: Profa. Dra. JANETE APPARECIDA DESIDERIO

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. GUILHERME DUARTE ROSSI

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

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

Profa. Dra. AGDA PAULA FACINCANI
Departamento de Tecnologia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Profa. Dra. ANA MARIA GUIDELLI THULER
Universidade de Uberaba / MG

Data da realização: 18 de julho de 2014.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Maria Laura Viola Augusto - nascida em 09 de dezembro de 1988 em Araraquara – SP, é bióloga, graduada no curso de Ciências Biológicas (Licenciatura plena e bacharelado com ênfase em Ciências Ambientais) pelo Centro Universitário de Araraquara (UNIARA), de Araraquara - SP em 2007, concluindo o curso em dezembro de 2010. Realizou estágio no Laboratório de Genética do Fundecitrus, em Araraquara de 2007 a 2009, onde desenvolveu seu Trabalho de Conclusão de Curso. Em 2010, foi estagiária do Laboratório de Microbiologia no Grupo Fisher S/A - Com. Ind. Agric. – Citrosuco, em Matão, realizando análises microbiológicas em suco de laranja. Em março de 2012 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas), da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp, Câmpus de Jaboticabal, desenvolvendo a pesquisa da presente dissertação como bolsista da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2012/14275-9).

Email:

marialauraa@gmail.com

“Se as coisas são inatingíveis... Ora, não é motivo para não querê-las... que tristes os caminhos que não fora a presença distante das estrelas...”.

Mário Quintana

**Aos meus pais Nair e
Rubens, por serem os
incentivadores
incondicionais dos
meus sonhos.**

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra. Janete Aparecida Desidério, pela orientação, ensinamentos, compreensão, pela confiança no desenvolvimento deste trabalho, e por todo carinho de mãe que tem por todas suas orientadas.

Ao meu co-orientador Guilherme Duarte Rossi, por toda a valiosa contribuição na construção deste trabalho, e pela sempre disponibilidade quando mais precisei.

À Eliane Cristina da Cunha Alves, por sempre estar disponível a ajudar nos experimentos, pelos ensinamentos, paciência e amizade nessa caminhada.

À Renata Izabel Dozzi Tezza, por toda dedicação e carinho com as análises de bioinformática. Sou imensamente grata a toda ajuda, assim como pelas conversas, risadas e amizade construída neste período.

Aos Doutores Manoel Victor Franco Lemos e Jackson Antônio Marcondes de Souza, pela participação na banca examinadora de qualificação e que muito contribuíram para esta dissertação.

Às Doutoradas Agda Paula Facincani e Ana Maria Guidelli Thuler, pela participação na banca da apresentação da desta dissertação, por todas as sugestões, críticas e ensinamentos, que muito ajudaram na finalização deste trabalho.

À todas as amigas que já passaram e as que estão no Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada todos os dias, enfrentando juntas as alegrias e dificuldades que a Biologia Molecular nos proporciona.

À Suzana Marucci, por me auxiliar desde o início do mestrado, transmitindo seus conhecimentos sempre com muita paciência, e que pelas voltas que a vida dá, nos uniu e nos fez amigas, mesmo sendo tão diferentes e tão parecidas ao mesmo tempo, é uma amiga que quero levar comigo para a vida toda.

Às irmãzinhas que a vida me deu, Flavia Ambrozino, Marcela Coelho, Claudia Daniele Souza e Luriany Ferraz, que mesmo a distância nosso amor, afinidade e amizade sempre é a mesma e sei que posso contar com todas a qualquer momento.

Aos amigos que fiz nestes três anos em Jaboticabal, Ana Beatriz Bianco, Matheus Bianco, Vitor Stoque, Neto Berlingieri e Rodrigo Sola, que sempre que podem estão presentes nas nossas festinhas, e todos os dias me proporcionam muitas risadas.

Ao meu namorado Renan Furlan, que nos momentos de ansiedade e nervosismo me acalmava e incentivava a prosseguir, pelos bons momentos que passamos e a todos os que estão por vir.

À minha família linda, que sempre foi meu porto seguro, meu apoio, acreditando em mim e me compreendendo em todos os momentos. Sem vocês nada faria sentido.

À FAPESP pelo apoio financeiro.

Á todos, que direto ou indiretamente contribuíram para a conclusão deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	xviii
LISTA DE FIGURAS.....	xx
RESUMO	xxiii
ABSTRACT	xxv
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 <i>Bacillus thuringiensis</i>	3
2.2 Quitinase	4
2.3 Resistência de pragas à toxinas de <i>B. thuringiensis</i> em plantas transgênicas.....	7
3 OBJETIVOS	9
4 MATERIAL E MÉTODOS	10
4.1 Isolado I_555 de <i>B. thuringiensis</i>	10
4.2 Condições de cultivo.....	10
4.3 Amplificação do gene completo da quitinase por PCR	10
4.4 Sequenciamento do gene <i>chi</i> _I555	12
4.5 Produção da árvore filogenética	13
4.6 Clonagem do gene <i>chi</i> _I555 no vetor pET SUMO	13
4.7 Extração do DNA plasmidial dos clones transformantes	15
4.8 Expressão do gene <i>chi</i> _I555	16
4.9 Detecção da proteína Chi_I555 por “Western blotting”	17
4.10 Detecção da atividade quitinolítica de Chi_I555	18

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
5.1 Amplificação do gene <i>chi</i> _I555	21
5.2 Clonagem do gene <i>chi</i> no vetor pET SUMO e confirmação dos clones contendo o gene de interesse por meio da amplificação por PCR	21
5.3 Sequenciamento e análise Bioinformática	22
5.4 Análise filogenética	26
5.5 Expressão heteróloga e detecção por “Western Blotting” de Chi_I555 ..	27
5.6 Determinação da atividade quitinolítica e do pH ótimo de Chi_I555 ...	28
6.CONCLUSÕES	31
7.REFERÊNCIAS	32

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação e sequenciamento do gene <i>chi_I555</i>	11
Tabela 2. Reagentes das reações de PCR	11
Tabela 3. Sequências utilizadas na construção da árvore filogenética	13
Tabela 4. Tampões com diferentes pHs utilizados para determinação do pH ótimo (citrato-fosfato de sódio 200mM - pH 2,6 a 7,0; fosfato de sódio 200mM - pH 7,0 a 8,0; Tris-HCl 200mM - pH 8,0 a 8,6 e Glicina-NaOH 200mM - pH 8,6 a 10,5)	20

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estrutura química da quitina. Fonte: BORGOGNONI et al., 2006.....	5
Figura 2. Mapa do vetor de clonagem e expressão pET SUMO (Invitrogen®) ..	11
Figura 3. Gel de agarose 0,8% indicando a amplificação do gene <i>chi_I555</i> . M: Marcador molecular 1kb DNA Ladder (Thermo Scientific®)	21
Figura 4. Géis de agarose 0,8% evidenciando a amplificação e a orientação correta de clonagem do gene <i>chi_I555</i> nos clones transformados utilizando marcador de peso molecular (1kb DNA Ladder - Thermo Scientific®) como referência. A: Amplificação do gene <i>chi_I555</i> a partir do DNA plasmidial obtido a partir de 10 clones de <i>E. coli</i> BL21transformadas utilizando os oligonucleotídeos ChiF e ChiR; B: Amplificação do gene <i>chi_I555</i> a partir do DNA plasmidial obtido a partir dos mesmos clones utilizando os oligonucleotídeos SUMOF e ChiR	22
Figura 5. Sequência completa do gene <i>chi_I555</i> , com destaque, para os primers utilizados durante o sequenciamento.....	23

Figura 6. Sequência de nucleotídeos (letras minúsculas) e de aminoácidos (letras maiúsculas) da quitinase (Chi_I555) de *B. thuringiensis* isolado I555. Sequência nucleotídica: códon de inicialização de leitura (ATG) – sublinhado simples; códon de finalização de leitura (TAG) – sublinhado duplo. Sequência peptídica: peptídeo sinal – em negrito; sítio ativo da quitinase – sombreado em cinza e letras brancas; domínio de fibronectina – sombreado em preto; domínio ligante de quitina – sombreado em cinza e letras pretas 25

Figura 7. Árvore filogenética construída pelo software Mega 5 a partir de sequências de quitinase de *B. thuringiensis*, utilizando o método Neighbor-Joining. Uma análise de bootstrap foi feita com 500 repetições 26

Figura 8. (A) Detecção da proteína recombinante Chi_I555 em gel de SDS-PAGE 10% utilizando Coomassie Blue R. (B) Detecção por “Western blotting” da proteína Chi_I555 utilizando o anticorpo antiHis (GE Healthcare®). 1- Cultura a 22°C por 5 h de células de *E. coli* BL21 contendo o vetor pET SUMO::*chi*_I555 sem a indução da expressão de Chi_I555 por IPTG; 2- Cultura a 22°C por 5 de células de *E. coli* BL21 contendo o vetor pET SUMO::*chi*_I555 após a indução da expressão de Chi_I555 por 0,5 mM de IPTG. M- marcador de peso molecular (kDa) “Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder” (Thermo Scientific) 27

Figura 9. Exemplo da determinação da atividade quitinolítica 28

Figura 10. Atividade relativa (%) da quitinase de *B. thuringiensis* I_555 (Chi_I555) produzida em sistema heterólogo. Tampões utilizados: 200 mM Citrato-fosfato de sódio (●), Fosfato de sódio (○), TRIS-HCl (▲), Glicina-NaOH (□). Média ± Erro padrão (n=3) 29

CARACTERIZAÇÃO DO GENE *chi_1555* E PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS DA QUITINASE DE *Bacillus thuringiensis*

RESUMO - *Bacillus thuringiensis* é uma bactéria que pode conferir patogenicidade a uma ampla variedade de insetos, e que possui fatores associados à mortalidade de insetos por *B. thuringiensis*, que foram identificados e são utilizados no controle de insetos-praga como, por exemplo, as toxinas Cry, Vip e Cyt. Novos genes de *B. thuringiensis* que possam estar envolvidos no processo de patogenicidade a insetos têm sido identificados, entre estes, as quitinases. Enzimas capazes de hidrolisar as ligações glicosídicas entre as unidades de *N*-acetilglicosamina da quitina, e aparecem como uma interessante opção por também mostrarem potencial para serem utilizadas no controle de pragas. No presente trabalho, realizou-se o isolamento e a caracterização de um gene de quitinase do isolado de *B. thuringiensis* I_555 (*chi_1555*) e a produção e caracterização parcial da quitinase (Chi_1555). A análise de *chi_1555* indicou uma fase de leitura aberta de 2025 pares de bases que codificam uma proteína com 674 aminoácidos e peso molecular de 74,24 kDa. Análises bioinformáticas indicaram a presença de um sítio ativo de quitinase, de um domínio de fibronectina e de um domínio ligante de quitina na proteína Chi_1555. A expressão heteróloga de Chi_1555 resultou na produção de uma quitinase ativa sobre o substrato "Chitin Azure" em uma faixa ótima de pH próxima do neutro. A proteína Chi_1555 utilizada neste estudo é altamente promissora para o uso em construções de plantas geneticamente modificadas.

Palavras chave: Atividade quitinolítica, *Bacillus thuringiensis*, fatores de virulência, quitinase, toxinas inseticidas

GENE CLONING AND BIOCHEMICAL PROPERTIES OF *chi*_I555 A CHITINASE FROM *Bacillus thuringiensis*

ABSTRACT - *Bacillus thuringiensis* is a bacterium that can confer pathogenicity to a wide variety of insects, and has associated with mortality of insects by *B. thuringiensis* factors that have been identified and are used to control insect pests such as the Cry toxins, Vip and Cyt. New genes of *B. thuringiensis* that may be involved in the pathogenic process of insects have been identified among these chitinases. Enzymes capable of hydrolyzing glycosidic linkages between the units of N-acetyl-glucosamine from chitin, and appear as an interesting option to also show potential for use in pest control. In this study, we carried out the isolation and characterization of a chitinase gene from *B. thuringiensis* isolate I_555 (*chi*_I555) and the production and partial characterization of a chitinase (Chi_I555). Chi_I555 analysis indicated an open reading frame of 2025 base pairs encoding a protein of 674 amino acids and a molecular weight of 74.24 kDa. Bioinformatics analysis indicated the presence of an active site of chitinase, a fibronectin domain and a chitin binding domain of the protein Chi_I555. Heterologous expression of Chi_I555 resulted in the production of an active chitinase on the substrate "Chitin Azure" in a great range of pH close to neutral. The Chi_I555 protein used in this study is highly promising for use in construction of genetically modified plants.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, chitinase, chitinolytic activity, insecticidal toxins, virulence factors

1. INTRODUÇÃO

B. thuringiensis é uma bactéria gram-positiva, esporulante, aeróbica ou facultativamente anaeróbica, naturalmente encontrada no solo e que produz cristais parasporais constituídos por proteínas conhecidas por sua ação inseticida (COSTA et al., 2009; HU et al., 2009). É o agente de controle microbiano de grande êxito no controle de insetos e, atualmente, corresponde a aproximadamente 2% do mercado total de inseticidas (BRAVO et al., 2011). Sua ação é praticamente restrita aos estágios larvais de diferentes ordens de insetos e mata-os através da destruição do tecido do intestino médio seguido de septicemia causada, provavelmente, não só por *B. thuringiensis*, mas provavelmente também por outras espécies de bactérias (RAYMOND et al., 2010).

Após a esporulação, as cepas de *B. thuringiensis* podem produzir inclusões cristalinas formadas por proteínas inseticidas denominadas Cry, conhecidas por sua eficiência e potencial para controlarem uma ampla gama de insetos-praga (BRAVO et al., 2011; RANDHAWA et al., 2011). Além das toxinas Cry, algumas cepas de *B. thuringiensis* também podem produzir toxinas inseticidas adicionais como as Proteínas Inseticidas Vegetativas (Vip) (ESTRUCH et al., 1996; YU et al., 2012), toxinas Cyt (GILL et al., 1992; BRAVO et al., 2007), bacteriocinas e enzimas hidrolíticas, entre as quais estão as quitinases (DRISS et al., 2005; PALMA et al., 2013, WANG et al., 2014).

As quitinases (E.C. 3.2.1.14) são enzimas da família das glicosil-hidrolases que catalisam a hidrólise de quitina e que podem ser encontradas em uma grande variedade de organismos, incluindo bactérias, plantas, fungos, insetos e crustáceos (USHARANI & GOWDA, 2011). As quitinases tem um imenso potencial para aplicações biotecnológicas (FEKETE et al., 2006; BEIER et al., 2011; PRASANA et

al., 2013), podendo ser usadas como agentes de controle de fungos fitopatogênicos e de insetos herbívoros ou vetores de doenças (RAMÍREZ-LEPE et al., 2012; BOYCE et al., 2013). Neste sentido, este trabalho teve como objetivo estudar o isolado I_555 de *B. thuringiensis* portador do gene da quitinase, por meio do sequenciamento, expressão, e estudos bioquímicos, a fim de verificar seu possível potencial como bioinseticida, ou como fonte de genes para construção de plantas pirâmidas de milho, diminuindo as chances do inseto se tornar resistente.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Bacillus thuringiensis*

Em todo o mundo, os ataques de insetos-praga nas monoculturas têm aumentado a preocupação com os impactos causados na produção. Essas monoculturas possuem diversas pragas que podem provocar danos econômicos significativos todos os anos. Os insetos têm sido uma das maiores danos na produção de alimentos sendo estas perdas da ordem de 20 a 30% da produção mundial (ESTRUCH et al., 1997).

O uso de produtos químicos para o controle de insetos praga na agricultura e de insetos vetores de doenças levou ao aumento de diversos problemas ambientais, como a poluição de solos e água, e também em efeitos na saúde de humanos e de animais, como o câncer e distúrbios no sistema imunológico (PURDUE et al., 2007; BRAVO, et al., 2011). Algumas das alternativas ao uso de inseticidas químicos são os bioinseticidas e as plantas transgênicas (VAECK et al., 1987), obtidos e produzidos a partir de microrganismos e de outras fontes naturais, os quais tem grandes benefícios para a agricultura e programas de saúde pública (GUPTA & DIKSHIT, 2010).

A bactéria *Bacillus thuringiensis* tem sido utilizada com sucesso há muitos anos como bioinseticida e também como uma importante fonte de genes para o desenvolvimento de plantas transgênicas (FANG et al., 2009; RAYMOND, et al., 2010). É efetivo contra espécies de insetos das ordens, Lepidoptera, Diptera, Hymenoptera, Coleoptera, dentre outras, onde se incluem importantes pragas agrícolas como *S. frugiperda*, *Diatraea saccharalis* e *Anticarsia gemmatalis* Hübner (COSTA, 2009).

B. thuringiensis possui forma de bastonete, apresenta interessantes propriedades entomopatogênicas, devido à produção de proteínas inseticidas, quando em condições específicas, em geral desfavoráveis ao seu crescimento, desenvolve um ciclo de esporulação típico dos bacilos. É encontrada naturalmente no solo além de outros substratos como superfícies de plantas, produtos armazenados e insetos (BRAVO et al., 1998; AZEVEDO et al., 2000).

Durante a fase de esporulação, produz cristais parasporais, que são predominantemente constituídos por um ou mais proteínas do tipo cristal (Cry) ou do tipo citolíticas (Cyt) (BRAVO, et al., 2007) proporcionando proteção contra uma ampla gama de insetos-praga das ordens Lepidoptera, Diptera e Coleoptera (RANDHAWA et al., 2011). Além destas toxinas, algumas cepas de *B. thuringiensis* produzem toxinas inseticidas adicionais, nomeadas de Proteínas Inseticidas Vegetativas (Vip) que são produzidas durante a fase de crescimento vegetativo e inclui toxinas binárias Vip1 e Vip2 com especificidade a coleópteros e Vip3 com atividade inseticida contra lepidópteros (ESTRUCH et al., 1996; YU et al., 2012).

Atualmente, o modo de ação de *B. thuringiensis*, é bem conhecido, após a ingestão dos cristais que contêm delta endotoxinas, estes são dissolvidos no trato digestivo do inseto, liberando as protoxinas. Por meio de um processo de proteólise, as protoxinas são quebradas em fragmentos, que se ligam a células do epitélio do trato digestivo. As proteínas ativadas induzem a formação de poros na membrana celular que causam alteração no balanço osmótico dessas células e leva à sua ruptura. Em consequência, o trato digestivo é paralisado e os insetos param de se alimentar. Poucas horas, após a digestão, a maioria dos insetos morrem. A afinidade entre os fragmentos dessas toxinas e os sítios de ligação no epitélio do trato digestivo é diretamente relacionada com a toxicidade (MAIA, 2003).

O controle biológico de pragas é uma das alternativas encontradas para a redução da utilização de pesticidas químicos. Bioinseticidas à base de *B. thuringiensis* mostram varias vantagem sobre o uso de agentes químicos, como sua alta especificidade ao inseto alvo (SCHNEPF et al., 1998). Porém, o uso extensivo de produtos de *B. thuringiensis* levou a um aumento da pressão de seleção que resultou na seleção de insetos resistentes à determinadas toxinas de *B. thuringiensis*, reduzindo os efeitos inseticidas (DRISS et al., 2005). Para solucionar os problemas de resistência, a piramidação de genes, modificação de genes e utilização de diferentes promotores para alterar o nível e o local de expressão de toxinas nas plantas, são alternativas utilizadas para reduzir o risco de desenvolvimento de resistência dos insetos-praga. Alternativas mais especulativas incluem a ação de outras toxinas bacterianas, inibidores de enzimas digestivas, lectinas de plantas e quitinase (WATKINS et al.; 2012).

2.2 Quitinase

Quitinases (E.C. 3.2.1.14) são enzimas do tipo glicosil hidrolases que catalisam a conversão de quitina aos seus componentes monoméricos e que podem ser encontradas numa grande variedade de organismos, incluindo bactérias, plantas, fungos, insetos e crustáceos (USHARANI & GOWDA, 2011). A quitina é estruturalmente idêntica à celulose (Figura 1), exceto pelos grupos hidroxilas (-OH) localizados na posição 2, que na quitina foram substituídos por grupos acetamino (NH.CO.CH₃). Depois da celulose, a quitina é o polímero orgânico mais abundante na natureza (BHATTACHARYA et al., 2007).

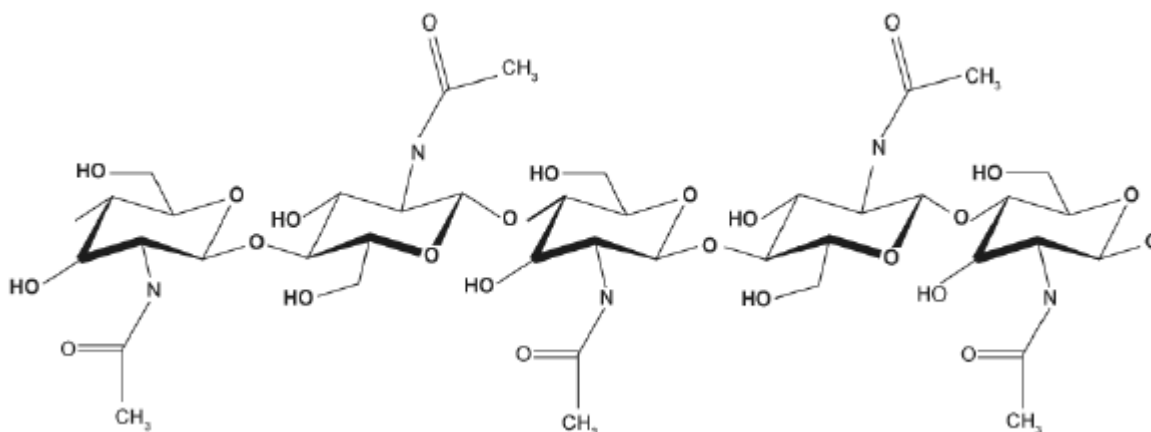


Figura 1. Estrutura química da quitina. Fonte: BORGOGNONI et al., 2006.

As quitinases foram agrupadas em famílias denominadas 18 e 19, sob a classe principal de enzimas glicosil hidrolases, de acordo com a similaridade de seqüências de aminoácidos (VITERBO et al.; 2002). As quitinases da família 18 estão presentes em vários organismos, incluindo bactérias, fungos, plantas, insetos, mamíferos e vírus (MATSUMOTO, 2006). Já as quitinases da família 19 são encontradas principalmente em plantas e algumas bactérias (KAWASE et al., 2004).

As quitinases são classificadas em duas categorias: endoquitinases (E.C. 3.2.1.14) que clivam sítios randômicos internos gerando multímeros de *N*-acetilglicosamina (NacGlc), como quitotetraose, quitotriosídeo e diacetilquitobiosídeo e as exoquitinases que catalisam a remoção sucessiva de unidades de NacGlc da extremidade não redutora da cadeia (ADRANGI et al., 2010).

São muitos os organismos capazes de sintetizar quitinases e, dependendo da fisiologia e da necessidade dos seus produtores naturais, podem realizar diversas funções. Em bactérias, as quitinases desempenham um papel na nutrição e no

parasitismo, enquanto que em protozoários e invertebrados elas estão envolvidas na morfogênese (PATIL et al., 2000). Em insetos elas estão envolvidas no desenvolvimento pós-embrionário e na degradação da cutícula (MERZENDORFER & ZIMOCH, 2003). Em fungos, as quitinases são úteis não só para a sobrevivência do organismo produtor, mas também é importante para o processo de bioconversão de resíduos de quitina (HOELL et al., 2005). Em crustáceos, atuam na digestão da quitina da membrana peritrófica e na defesa contra agentes patogênicos (SALMA et al., 2012). O papel da quitinase em vertebrados é incerta, no entanto, pode ser envolvido na resistência a infecções fúngicas (BHATTACHARYA et al., 2007).

Como as quitinases de plantas são mais numerosas, elas foram divididas em 5 classes independente das famílias das glicosil hidrolases. Essas classes são determinadas pela sequência N-terminal, ponto isoelétrico, localização da enzima, peptídeo sinal e indutores (PATIL et al., 2000). Quitinases classe I tem um domínio N-terminal de ligação a quitina rico em cisteína e um domínio catalítico C-terminal ligados por um pequeno peptídeo de 10 a 20 resíduos de aminoácidos. Já as quitinases classe II possuem apenas o domínio catalítico homólogo ao da classe I. Quitinases classe IV são homólogas a classe I mas menores. Classe III e classe V não apresentam homologia com a classe I, II e IV, mas tem sequências similares a quitinases de fungos e bactérias (SEIDL, 2008; FUNKHOUSER & ARONSON, 2007).

Bactérias que produzem estas enzimas quitinolíticas afetam a membrana peritrófica larval do inseto, que normalmente separa o epitélio do intestino médio do lúmen intestinal. A membrana peritrófica consiste de uma rede de quitina incorporada em uma matriz de proteínas e carboidratos e fornece uma barreira física contra danos e invasão de microrganismos. Assim, o aumento do nível de quitinases no intestino médio das larvas pode proporcionar o aumento do efeito larvicida como resultado da perfuração da membrana peritrófica permitindo maior acessibilidade das moléculas delta-endotoxinas nas membranas epiteliais (REGEV et al., 1996), e devido a isso, são utilizadas com sucesso na combinação com os cristais de delta-endotoxinas produzidos naturalmente por *B. thuringiensis*, a fim de aumentar a sua atividade inseticida (DRISS et al., 2010).

As quitinases podem ser utilizadas como uma proteína adicional às toxinas de *B. thuringiensis*, sendo introduzida em plantas, permitindo o desenvolvimento de

uma nova variedade, visando diminuir a resistência dos insetos as plantas (DING, et al., 2008).

2.3 Resistência de pragas à toxinas de *B. thuringiensis* em plantas transgênicas

O desenvolvimento de resistência caracteriza-se pela redução da suscetibilidade de uma população de insetos a uma toxina. O surgimento de populações resistentes às proteínas de *B. thuringiensis*, deve-se também, à origem dos cultivares transgênicos (TABASHNIK et al., 1994; TABASHNIK et al., 2005). Desde 1996, diversas plantas transgênicas, surgiram para controlar de forma eficiente insetos pragas e diminuir o uso de inseticidas químicos (KLETER, et al., 2007).

Em plantas geneticamente modificadas, as lagartas, ao se alimentarem do tecido foliar, ingerem a proteína de *B. thuringiensis* que atua nas células epiteliais do tubo digestivo das mesmas (MEYERS et al., 1997). Esta promove a ruptura osmótica irreversível das células e causa a morte dos insetos, antes que eles consigam causar danos econômicos à cultura (PIETRANTONIO et al., 1993; GILL, 1995).

O desenvolvimento da resistência a plantas transgênicas Bt anularia os benefícios dessa nova tecnologia empregada em milhões de hectares em todo o mundo. Entre os benefícios do cultivo de plantas Bt está a redução no uso de inseticidas de alta toxicidade para o homem, como os organofosforados e piretroides, como é o caso do algodão Bt nos EUA. A evolução da resistência a toxinas Bt, expressas em plantas transgênicas, numa população de insetos, é afetada por um grande número de fatores que interagem entre si e são relacionados a características do material genético da planta transgênica, à bioecologia e genética da praga alvo, ao manejo da cultura e ao ambiente da região de cultivo (MAIA, 2003).

Qualquer alteração no modo de ação das toxinas de *B. thuringiensis* poderá acarretar no desenvolvimento da resistência: 1) modificação no sítio de ligação da toxina à membrana; 2) mudança na atividade proteolítica no intestino do inseto; 3) aumento na velocidade de reparação do tecido epitelial danificado. A primeira alteração é a que gera os maiores níveis de resistência. Ela tem sido descrita tanto

em populações resistentes capturadas em campo como em populações selecionadas artificialmente em laboratório (BERGAMASCO, 2008).

Uma grande quantidade de fatores fisiológicos do organismo dos invertebrados também, pode proporcionar o surgimento de resistência dos insetos às toxinas de *B. thuringiensis*. Esses fatores incluem dificuldades na solubilização das proteínas no intestino do inseto, defeito na clivagem proteolítica das toxinas, degradação das toxinas por proteases intestinais, dificuldade na ligação das toxinas aos receptores intestinais, defeito na formação do poro, reparação do tecido epitelial, elevada resposta imune e elevada produção de esterases (GRIFTTS & AROIAN, 2005; GUNNING et al., 2005). Para retardar a evolução da resistência de pragas à culturas transgênicas esta sendo utilizada a estratégia da construção de plantas pirâmidas, ou seja, que combinam duas ou mais toxinas diferentes, que matam a mesma praga. (BRÉVAULT et al., 2013)

A eficácia de uma combinação não é estimada com base na eficácia dos componentes individuais, mas com base no estudo de sinergismo. Plantas pirâmidas oferecem alternativa viável para retardar a resistência em populações de insetos-praga. A principal vantagem deste método é que a resistência causada por uma toxina pode não acarretar resistência cruzada à outra toxina, uma vez que os receptores são diferentes (CRIALESI-LEGORI et al., 2014). Portanto, a construção de plantas geneticamente modificadas, que possam ter uma maior resistência a insetos, pode incluir além das toxinas Cry, Cyt e Vip de *B. thuringiensis*, o uso de gene de outras espécies de plantas para a produção de lectinas e inibidores de proteinases (LOC et al., 2002; CECI et al., 2003), ou ainda a utilização de genes de animais para expressão de neurohormônios (FITCHES et al., 2002), inibidores enzimáticos (CRISTELLER et al., 2002), ou a enzima quitinase. Neste sentido, amplos estudos da quitinase devem ser realizados para sua possível utilização na produção de bioinseticidas mais eficazes, ou na doação do gene, para a produção de plantas geneticamente modificadas resistentes a insetos.

3. OBJETIVOS

- Sequenciamento do gene completo da quitinase a partir do isolado I555 de *B. thuringiensis* de solo brasileiro.
- Clonagem e expressão do gene *chi_I555* em *E. coli*.
- Determinação da atividade quitinolítica e do pH ótimo de *chi_I555*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

As análises moleculares do presente estudo foram realizadas no Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA), do Departamento de Biologia Aplicada a Agropecuária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Câmpus de Jaboticabal, SP.

4.1 Isolado I_555 de *B. thuringiensis*

Para a realização dos experimentos foi utilizado o isolado I_555 de *B. thuringiensis*, proveniente de solo brasileiro, previamente caracterizado como portador do gene da quitinase por Lemes, 2009, e selecionado para este estudo por apresentar mortalidade em ensaios de bioensaio utilizando o sobrenadante, de 90,65% contra larvas de *Spodoptera frugiperda*.

4.2 Condições de cultivo

O estoque da cepa é feito na forma de fita de papel filtro impregnada com uma suspensão de esporos em água estéril e mantidas a 4°C. Uma alíquota de suspensão de esporos foi estriada em placas de Petri contendo meio BHI (“Brain Heart Infusion Broth”, contendo infusão de cérebro bovino 12,5 g/L, infusão de coração bovino 5 g/L, peptona 10 g/L, glicose 2 g/L, cloreto de sódio 5 g/L, fosfato de sódio bibásico 2,5 g) adicionado de ágar 15 g/L e acondicionadas a 30°C, por 16 h.

O DNA total do isolado foi obtido com a utilização da resina de troca iônica InstaGene Matrix (Bio-Rad), seguindo instruções do fabricante.

4.3 Amplificação do gene completo da quitinase por PCR

Para amplificação do gene da quitinase de *B. thuringiensis* (*chi_I555*), o DNA do isolado foi submetido à técnica de PCR com oligonucleotídeos iniciadores (Tabela 1) elaborados com base na sequência de ChiA74 (BARBOZA-CORONA, 2003) e no alinhamento das sequências de genes de quitinase de *B. thuringiensis* depositadas no banco de dados NCBI (AY452507.1, AF424979.1, AY189740.2, AY129671.1, AF526379.1).

Tabela 1: Oligonucleotídeos iniciadores para amplificação do gene *chi* completo

Iniciadores	Sequência
ChiF	5' ATG AGG TCT CAA AAA TTC 3' (d)
ChiR	5' CTA GTT TTC GCT AAT GAC 3' (r)

(d): direto; (r): reverso

As reações de amplificação do gene *chi*_{I555} foram otimizadas de acordo com as sequências dos iniciadores e as concentrações dos reagentes utilizados para amplificação do gene estudado estão discriminadas na Tabela 2:

Tabela 2. Reagentes das reações de PCR

Reagentes	Volume
DNA (50 ng)	2,0 µL
dNTP (10 mM)	0,5 µL
MgSO ₄ (50 mM)	1,0 µL
Tampão (10X)	2,5 µL
Iniciadores (10 pmoles)	1,0 µL
Platinum Taq DNA polymerase High Fidelity (0,5U)	0,2µL
Água (q.s.p)	16,8 µL

O programa utilizado para a amplificação do gene *chi*_{I555} consistiu de um ciclo de 2 min a 94°C, 30 ciclos de 1 min a 95°C; 1 min a 48°C e 2 min a 68°C e um passo adicional para extensão final de 68°C por 5 min.

O produto da reação, referente ao gene *chi*_{I555}, foi analisado através de eletroforese em gel de agarose 0,8%, utilizando-se 10 µL do produto da PCR em tampão de azul de bromofenol (Tris – HCl 0,1M, pH 6.8; azul de bromofenol 0,02%; glicerol 50%). Após aplicado em gel de agarose 0,8%, contendo brometo de etídio (0,5 mg/mL) e submetido à corrida eletroforética por, aproximadamente, 2 h 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), o fragmento de DNA amplificado foi visualizado pela incidência de luz UV e documentado em um fotodocumentador modelo GEL DOC 2000 (BIO-RAD).

4.4 Sequenciamento do gene *chi_I555*

Para a obtenção da sequência completa do gene *chi_I555* para depósito no banco de dados, foi utilizada a técnica de “primer walking” utilizando-se inicialmente os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação do gene (Tabela 1).

As reações de sequenciamento foram realizadas em reação contendo “Big Dye Terminator v3.1”. Estas foram constituídas de 1,5 µL de H₂O Mili-Q estéril, 4,0 µL de tampão de sequenciamento [2,5X] (Tris-HCl 200 mM pH 9,0 e MgCl₂ 5 mM), 1,0 µL de BigDye 3 Terminator, 2,5 µL de produto de PCR purificado (50 ng) e 1,0 µL do oligonucleotídeo iniciador (10 pmoles), sendo cada ciclo composto pelas seguintes etapas: 2 min a 96°C, 25 ciclos de 10 s a 96°C; 20 s a 50°C, 4 min a 60°C, e ao término do ciclo as amostras foram mantidas a 4°C.

Em seguida, 80 µL de isopropanol 75% foram adicionados a cada reação. Após 15 min à temperatura ambiente, as reações foram centrifugadas a 2683 xg, em centrífuga de placas (Eppendorf 5804 R), por 45 min a 20° C. Após precipitação do DNA, o sobrenadante foi descartado e as amostras lavadas, duas vezes, com 200 µL de etanol 70% seguido de centrifugação a 2683 xg, por 15 min a 20° C. As amostras foram secas em fluxo laminar por 50 min, ressuspensas em 10 µL de formamida, desnaturadas a 95° C por 5 min em termociclador, e posteriormente submetidas ao sequenciamento em um sequenciador automático ABI 3100, conforme metodologia sugerida pelo fabricante do equipamento (Applied Biosystems). As análises bioinformáticas para montagem do gene *chi_I555* foram feitas no Laboratório de Bioinformática do CREBIO (Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – FCAV/UNESP.

A sequência de DNA do gene *chi_I555*, completa, obtida foi traduzida utilizando a ferramenta “Translate” (<http://expasy.org/tools/>), seus domínios e funções foram analisados com os programas “InterPro” (<http://www.ebi.ac.uk/interpro>), e “blastp” disponível no NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). A presença de peptídeo sinal na proteína Chi_I555 foi determinada pela ferramenta “SignalP 4.1” disponível no portal Expasy.

4.5 Produção da Árvore filogenética

A sequência de Chi_I555 foi utilizada no “blastp” (www.ncbi.nlm.nih.gov) para comparação de similaridade com outras sequências disponíveis no GenBank. Foram escolhidas onze sequências, sendo duas destas, utilizadas como grupo externo (Tabela 3). As sequências selecionadas, mais a sequência de Chi_I555 foram alinhadas pelo programa Clustal W (THOMPSON, et al., 1994), por alinhamento múltiplo de sequências, com número de “bootstrap” igual a 1000. O alinhamento foi utilizado para a produção da árvore filogenética pelo método de “Neighbor-Joining”, com “bootstrap” de 500 réplicas, utilizando o programa Mega 5 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, version 5; KUMAR et al., 2001).

Variedade	Número de Acesso	Identidade	Referência
<i>B. thuringiensis</i> serovar <i>tenebrionis</i> (Quitinase)	AHA95666.1	99%	Li et al. (2013)
<i>B. thuringiensis</i> serovar <i>tenebrionis</i> (Endoquitinase)	AHZ90558.1	99%	Barboza-Corona et al. (2014)
<i>B. thuringiensis</i> serovar <i>kurstaki</i> (Quitinase)	ABQ65137.2	99%	Barboza-Corona et al. (2008)
<i>B. thuringiensis</i> serovar <i>colmeri</i> (Quitinase)	ABF57674.1	99%	Lu et al. (2006)
<i>B. thuringiensis</i> serovar <i>canadensis</i> (Quitinase)	AAR21234.1	98%	Lin et al. (2003)
<i>B. thuringiensis</i> serovar <i>entomocidus</i> (Quitinase)	AAR19226.1	98%	Lin et al. (2003)
<i>B. thuringiensis</i> serovar <i>toumanoffi</i> (Quitinase)	AAR19091.1	98%	Lin et al. (2003)
<i>B. thuringiensis</i> serovar <i>israelensis</i> (Quitinase)	AAM88400.1	98%	Zhong et al. (2003)
<i>B. thuringiensis</i> serovar <i>morrisoni</i> (Endoquitinase)	ABJ55984.1	97%	Okay et al. (2006)
<i>Bacillus cereus</i> (Quitinase) - Grupo Externo	KDB40316.1		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> – (Quitinase) – Grupo externo	KEI28634.1		McGann, et al. (2014)

Tabela 3. Sequências utilizadas na construção da árvore filogenética

4.6 Clonagem do gene *chi* no vetor pET SUMO

O gene *chi_I555*, previamente sequenciado, foi clonado no vetor de expressão pET SUMO (Invitrogen®) de acordo com as indicações do fabricante

(Figura 2) para obtenção da toxina. O vetor recombinante obtido (pET SUMO::*chi_I555*) foi utilizado para transformação, por choque térmico, de células competentes de *E. coli* BL21 (DE3).



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

Para a clonagem de *chi_I555* no vetor pET SUMO, inicialmente foi realizada a reação de ligação utilizando-se 150 ng do produto da amplificação purificado de *chi_I555*, 50 ng de vetor pET SUMO, 1 μ L de tampão de ligação 10X, 3U de enzima T4 ligase e água estéril (q.s.p) em uma reação de volume final de 10 μ L. A reação foi incubada durante 16 h a 15° C.

Após este período 2 μ L do produto da reação de ligação foram adicionados a um tubo Eppendorf contendo 50 μ L de células de *E. coli* BL21(DE3) One Shot e a inserção de pETSUMO::*chi_I555* foi realizada por meio do método de choque térmico e selecionada em placas de LB (10 g de triptona/L; 0,5 g de extrato de levedura/L e 10 g de NaCl/L, adicionada de ágar 15g/L conferir), contendo 50 μ g/mL de canamicina (SAMBROOK & RUSSEL, 2001). As placas foram incubadas em estufa a 37° C por 16 h.

Os clones resultantes foram transferidos, para tubos tipo Falcon contendo 3 mL de meio de cultura LB líquido suplementado com canamicina (50 μ g/mL) e as

células foram multiplicadas a 37° C por 12 h sob agitação constante de 6.708 xg. Posteriormente, uma alíquota de 700 µL foi assepticamente estocada em glicerol (100%) estéril e armazenada em ultra-freezer a -80° C.

4.7 Extração do DNA plasmidial dos clones transformantes

O restante da suspensão de células de *E. coli* BL21 contendo pET SUMO::*chi*_I555 (2,3mL, item 3.5) foi centrifugada por 5 min a 17.949 xg e os sobrenadantes foram descartados. Foram adicionados às amostras 200 µL da solução 1 (25 mM de Tris-HCl pH 8,0, 10 mM de EDTA, 50 mM de D-glicose), previamente resfriados, agitados até a completa solubilização das células e mantidos a temperatura ambiente por 5 min. Em seguida, 200 µL da solução 2 (0,2 N de NaOH, 1% de SDS) foram adicionados às amostras. A solução foi levemente homogeneizada por meio da inversão dos tubos e mantida no gelo por 5 min. Decorrido este período, 150 µL da solução 3 (3 M de acetato de potássio, 2 M de ácido acético, pH= 5,2) foi adicionados à solução. Os tubos foram levemente invertidos algumas vezes a fim de misturar a solução e mantidos por 5 min no gelo. Os tubos foram, posteriormente, submetidos a 5 min de centrifugação a 17.949 xg. 500 µL do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo e 500 µL de fenol/clorofórmio 1:1, adicionados à solução. Após 2 min de homogeneização em vortex, procedeu-se a centrifugação das amostras por 5 min a 17.949 xg. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e procedeu-se a desproteinização com 1 volume de clorofórmio. As amostras foram centrifugadas por 5 min a 17.949 xg e a fase aquosa foi transferida para um novo tubo de centrífuga de 1,5 mL. O DNA foi precipitado por meio da adição de 700 µL de etanol absoluto (temperatura ambiente) à solução. As amostras foram misturadas e mantidas a temperatura ambiente por 5 min. Feito isto, as amostras foram centrifugadas a 17.949 xg por 5 min e o sobrenadante foi descartado. O precipitado de DNA foi lavado, por duas vezes, com 1 mL de etanol 70%, secado sob vácuo e ressuspenso em 30 µL de TE (Tris HCl 10 mM pH 8,0 e EDTA 0,1 M pH 8,0) contendo RNase A (0,01 mg/mL). O DNA foi armazenado a -20° C até sua utilização.

O DNA plasmidial dos clones foi quantificado em aparelho NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

4.8 Expressão do gene *chi_I555*

Para a obtenção de uma colônia de *E. coli* BL21 contendo o plasmídeo pET SUMO::chi_I555, 12 µL da cultura estoque foram plaqueados em placas de Petri contendo meio de cultura LB sólido, suplementado com 50 µg canamicina/mL, as placas foram incubadas por 16 h a 37° C.

Em seguida, uma colônia do material cultivado na placa de Petri foi transferida para tubo tipo Falcon (50 mL) contendo 4 mL de meio LB e 50 µg canamicina/mL. Realizou-se o cultivo a 37°C e 250 rpm por 16 h.

Após esse período, 2 mL do pré-inóculo foram transferidos para um erlenmeyer com capacidade de 1000 mL contendo 200 mL de meio LB e 50 µg canamicina/mL e incubados a 37°C sob agitação de 250 rpm até que a D.O._{595nm} estivesse entre 0,5 e 0,8. Em seguida, as culturas foram induzidas (I) adicionando-se IPTG (isopropiltiogalactosídeo) na concentração final de 0,5 mM e mantidas por 5 h, a 22°C, sob agitação de 200 rpm. Um cultivo controle sem a indução da expressão foi realizado (NI).

As culturas I e NI, tiveram as células coletadas por centrifugação em tubos plásticos em centrífuga Beckman® por 30 min a 17.400 x g e os “pellets” obtidos foram mantidos em gelo. Para o início da lise celular foram adicionados aos “pellets” bacterianos 10 mL de tampão de lise (50 mM Fosfato de Potássio pH 7,8; 400 mM NaCl; 100 mM KCl; 10% Glicerol; 0,5% Triton X-100; 10 mM Imidazol) ressuspenso por agitação vigorosa em aparelho do tipo “vortex”. Após, adicionou-se 300 µL de lisozima (100 mg/mL), 100 µL de DNase I (1 mg/mL) e 10 µL de PMSF (0,1M preparado em álcool). Em seguida as amostras foram incubadas a 37° C por 30 min sob agitação suave.

Para o total rompimento das células as amostras foram acondicionadas em gelo e submetidas à sonicação com 30% de potência, por 60 s com intervalo de 15 s, sendo este passo repetido três vezes. Em seguida o material foi centrifugado a 17.400 x g por 30 min a 4° C, o sobrenadante foi transferido para tubos tipo Falcon de 15 mL estéreis e foram guardados a -20° C até o uso.

As amostras sujeitas à separação eletroforética foram preparadas coletando-se 20 µL do sobrenadante de cada cultivo (I e NI) e 10 µL de tampão de carregamento de amostra [0,187M de Tris, pH 7,0; SDS 2,0% (m/v); Azul de Bromofenol 1,0% (m/v); glicerol 27% (v/v) e β-mercaptoetanol 5,0% (v/v)]. Essas

amostras foram aquecidas por 5 min a 100°C e uma alíquota de 15 µL foi aplicada no gel. Em todos os géis, utilizou-se do marcador “Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder” (Thermo Scientific) para monitorar a separação das proteínas durante a eletroforese e o peso molecular das mesmas.

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada utilizando o sistema “Mini-PROTEAN® 3 Cell” (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 o gel de empilhamento na concentração de 5% de poliacrilamida e 0,5% SDS. A eletroforese foi realizada em tampão Tris-Glicina (50 mM de Tris, pH 8,6; 1,92 M Glicina e 1% SDS), a 30 mA e 200 V por 90 min em temperatura ambiente.

Após a eletroforese os géis foram imersos em recipientes plásticos contendo 30 mL de solução de coloração “Coomassie-Brilliant Blue R-250” 0,1% (m/v), dissolvido em 50% de metanol e 10% de ácido acético por 15 min. Em seguida foi realizada uma lavagem com solução descorante (10% de metanol e 10% de ácido acético), por 12 h sob agitação constante. Os géis foram lavados em água corrente, e colocados em plásticos transparentes para digitalização.

4.9 Detecção da proteína Chi_I555 por “Western blotting”

Para a realização da técnica de “Western blotting”, o gel de SDS-PAGE, foi feito conforme descrito anteriormente, porém, este não foi corado. O gel contendo a amostra e o marcador “Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder” (Thermo Scientific) foi eletro-transferido em cuba de transferência úmida “Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell” (Bio-Rad) para uma membrana “Amersham Hybond-P PVDF” (GE Healthcare), utilizando-se de um tampão de transferência (48 mM de Tris/L; 39 mM de glicina/L, 0,037% de SDS (m/v), 20% (v/v) de metanol pH 8.3) sendo o processo realizado a 100 V por 1 h e a 4°C.

Após ser removida do cassete, a membrana foi umedecida com Metanol 100% e lavada em água destilada por 5 min. O bloqueio de ligações inespecíficas na membrana foi realizado utilizando 10 mL de tampão PBS-T (8 g de NaCl/L; 0,2 g de KCl/L; 1,44 g de Na₂HPO₄/L; 0,24 g de KH₂HPO₄/L e 0,1% Tween-20) adicionado de 5% (m/v) de leite em pó desnatado (LPD) e, mantido em agitação suave por 1 h a 25°C. Após este período a membrana foi enxaguada por 2 vezes em tampão PBS-T.

Em seguida, a membrana foi colocada em uma solução contendo o anticorpo primário: “Anticorpo Monoclonal Anti-polyHistidine, Clone HIS-1” (Sigma-Aldrich) e PBS-T na proporção de 1:5000, e mantida em agitação suave por 1 h a 25°C

Após lavagens com PBS-T, procedeu-se a reação com anticorpo secundário: “Amersham ECL Anti-Mouse IgG, Horseradish Peroxidase-Linker Species-Specific Whole Antibody (from sheep)” (GE Healthcare®) na diluição 1:5000 em PBS-T. Após a incubação por 1 h a 25° C, a membrana foi novamente lavada com PBS-T.

O sistema de detecção da marcação foi por meio da mistura do cromógeno mais substrato específico “SIGMAFAST™ DAB With Metal Enhancer Tablet Set” (Sigma-Aldrich®) e para a interrupção da reação, 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).

4.10 Detecção da atividade quitinolítica de Chi_I555

A atividade quitinolítica da proteína Chi_I555 foi verificada por meio da incubação do extrato enzimático com o substrato “Chitin azure” (Sigma Aldrich®). O extrato enzimático contendo a proteína Chi_I555 foi obtido por meio da filtração do extrato proteico de células induzidas a produzir a proteína *chi_I555* em uma coluna do tipo Amicon® (50,000 MWCO) (Millipore®) para evitar que a lisozima (PM = 12 kDa) presente no tampão de lise interferisse no ensaio. A filtração foi realizada seguindo recomendações do fabricante. O volume retido contendo proteínas com peso molecular superior a 50 kDa foi utilizado e o volume inicial da amostra foi reestabelecido para 500 µL.

O substrato “Chitin Azure” foi preparado em sua forma coloidal de acordo com o método descrito por Ramirez et al. (2004) com algumas alterações. O substrato “Chitin Azure” (100mg) foi incubado com 1 mL de HCl (37% p/v) por 40 min a 25° C em constante agitação manual. Após este período, 20 mL de água foram adicionados à solução de “Chitin Azure” em HCl. O substrato “Chitin Azure” foi sedimentado por centrifugação (10.000g x 25° C por 10 min) e o sobrenadante foi descartado. Duas lavagens com tampão fosfato de sódio 200 mM pH 7,0 foram realizadas e mais duas lavagens com água destilada foram realizadas por meio de centrifugação para que o pH da solução se tornasse neutro. O substrato “Chitin Azure” em sua forma coloidal foi ressuspenso com água destilada para que a

concentração final da solução ficasse igual a 10 mg/mL e o substrato em sua concentração final foi esterilizado em autoclave (120 atm por 20 min).

Para determinar a atividade enzimática da quitinase, foram utilizados 5 tubos de ensaios, para cada tempo (0, 60, 120, 180, 240 min). 200 μ L do extrato enzimático, foram incubados com 100 μ L de quitina coloidal (10 mg/mL) e 100 μ L de tampão fosfato de sódio 200mM pH 7,0, em uma temperatura de 30° C em agitação de 150 rpm, por 4 h. Em intervalos de 1 h, foram adicionados em cada tubo de ensaio, 200 μ L de HCl 1N para interromper a reação. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 10.000g por 10 min a 25° C e a leitura do sobrenadante foi feita em espectrofotômetro a 550 nm. Foram realizadas três repetições para determinação da atividade quitinolítica. Foi definido que uma unidade de atividade enzimática (U) é a quantidade de enzima capaz de produzir o incremento de 0,001 unidades de absorbância a 550 nm por minuto.

Para determinação do pH ótimo de Chi_I555, a atividade de quitinase do extrato enzimático foi realizada do mesmo modo que descrito anteriormente, porém mudando o tampão da reação para diferentes pHs (Tabela 4). Reações controle para verificar se a enzima (branco de enzima) ou se o substrato (branco de substrato) produziria coloração não relacionada com a atividade sobre o substrato nas condições dos ensaios foram realizadas.

Tabela 4. Tampões com diferentes pHs utilizados para determinação do pH ótimo (citrato-fosfato de sódio 200mM - pH 2,6 a 7,0; fosfato de sódio 200mM - pH 7,0 a 8,0; Tris-HCl 200mM - pH 8,0 a 8,6 e Glicina-NaOH 200mM - pH 8,6 a 10,5)

Tampão da Reação	pH
Citrato-fosfato de sódio 200 mM	2,6
Citrato-fosfato de sódio 200 mM	3
Citrato-fosfato de sódio 200 mM	3,6
Citrato-fosfato de sódio 200 mM	4
Citrato-fosfato de sódio 200 mM	4,4
Citrato-fosfato de sódio 200 mM	5
Citrato-fosfato de sódio 200 mM	5,4
Citrato-fosfato de sódio 200 mM	6
Citrato-fosfato de sódio 200 mM	6,4
Citrato-fosfato de sódio 200 mM	7
Fosfato de sódio 200 mM	7
Fosfato de sódio 200 mM	7,5
Fosfato de sódio 200 mM	8
Tris-HCl 200 mM	8
Tris-HCl 200 mM	8,6
Glicina-NaOH 200 Mm	8,6
Glicina-NaOH 200 Mm	9
Glicina-NaOH 200 Mm	9,5
Glicina-NaOH 200 Mm	10
Glicina-NaOH 200 Mm	10,5

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Amplificação do gene *chi*_{I555}

A amplificação de *chi*_{I555} resultou em um produto de aproximadamente 2100 pb (Figura 3), valor próximo do observado pela análise do sequenciamento (2025pb). A sequência de *chi*_{I555} foi depositada no GeneBank sob número de acesso a ser disponibilizado futuramente.

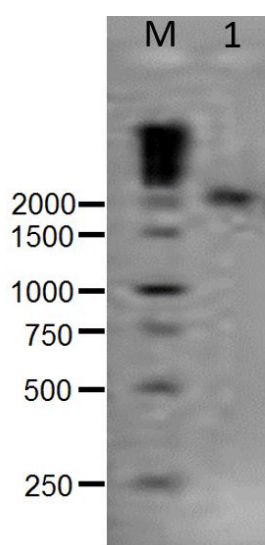


Figura 3. Gel de agarose 0,8% indicando a amplificação do gene *chi*_{I555} (1). M: Marcador molecular 1kb DNA Ladder (Thermo Scientific[®]).

5.2 Clonagem do gene *chi* no vetor pET SUMO e confirmação dos clones contendo o gene de interesse por meio da amplificação por PCR

O produto amplificado referente a *chi*_{I555}, foi clonado no vetor pET SUMO (Invitrogen[®]), o DNA plasmidial foi extraído, quantificados em aparelho NanoDrop 2000 (Thermo Scientific[®]) e utilizado em reações de PCR com os oligonucleotídeos específicos permitindo visualizar presença ou ausência do inserto através do produto amplificado. As reações de amplificação e as condições de termociclagem estão descritas no item 3.2.

Além dos oligonucleotídeos já descritos para o gene de interesse (Tabela 1), foi utilizado também, os oligonucleotídeo SUMO F e ChiR, cuja sequência de SUMO

F está presente no vetor pET SUMO o que permitiu verificar se o gene clonado estava na orientação de leitura correta com o promotor.

A partir do DNA plasmidial de 10 clones obtidos na transformação (item 4.7), 9 geraram bandas em reação de PCR, utilizando os oligonucleotídeos ChiF e ChiR para verificação da presença de *chi_1555* (Figura 4A). No entanto, só foram selecionados os clones que apresentaram produtos de amplificação tanto para os oligonucleotídeos específicos para o gene (ChiF e ChiR) quanto para o oligonucleotídeo SUMO F.

Como por exemplo, na Figura 4B observa-se que, utilizando-se os oligonucleotídeos ChiF e ChiR houve a amplificação do produto correspondente a 2100 pb, referente ao gene *chi*, em 9 clones obtidos, no entanto, quando se utiliza os oligonucleotídeos SUMO F-ChiR apenas os clones 1, 2, 4, 6, 7 e 9 amplificaram o produto de 2200 pb, ou seja, continham 100 pb, referente ao gene para a proteína SUMO. Desta forma, somente estes clones foram selecionados para os testes de expressão.

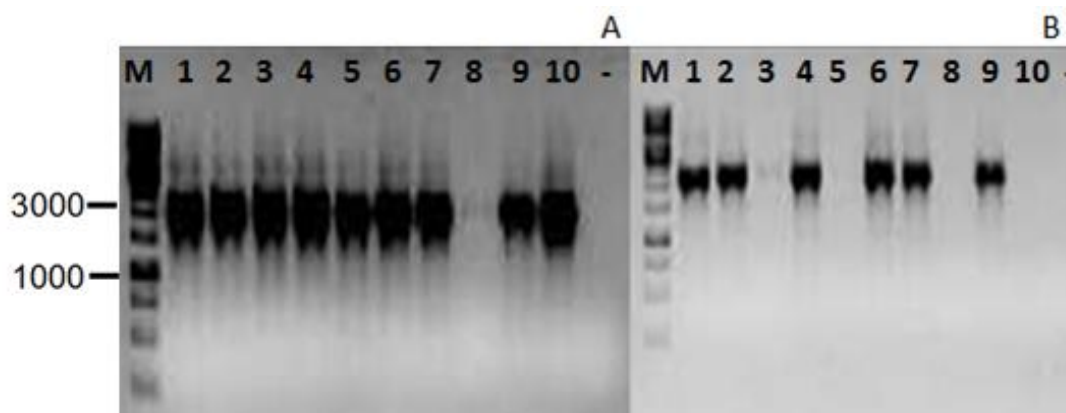


Figura 4. Géis de agarose 0,8% evidenciando a amplificação e a orientação correta de clonagem do gene *chi_1555* nos clones transformados utilizando marcador de peso molecular (1kb DNA Ladder - Thermo Scientific®) como referência. A: Amplificação do gene *chi_1555* a partir do DNA plasmidial obtido a partir de 10 clones de *E. coli* BL21 transformadas utilizando os oligonucleotídeos ChiF e ChiR; B: Amplificação do gene *chi_1555* a partir do DNA plasmidial obtido a partir dos mesmos clones utilizando os oligonucleotídeos SUMOF e ChiR.

5.3 Sequenciamento e análise Bioinformática

Os iniciadores utilizados nas reações de sequenciamento desenhados de acordo com as necessidades para o fechamento do gene *chi_1555*, foram ChiF,

ChiR, Chi1_R (ATG CGA GAT TTG GAG TAA), Chi2_F (TCC TAA TGG TAC TCT CGT), Chi3_F (GAA CTG TAA AGA ATC TGG TGT), Chi4_R (AGC AGC ATC TTT GGC A), Chi5_R (CAG CAG CAT CTT TGG C), Chi6_F (CCT GAT GGA AAT GGT ACT GC), Chi7_R (TGC TTT GGT GAA TCT GC), Chi8_R (CGA AAG CAT AGT TAA GGT GAG), Chi9_F (GAA CTA AGC GGA GAT TGC), Chi10_F (ATA CTG AGC CAC CAA CGA), para obtenção da sequência do gene completo (Figura 5). Cada reação de sequenciamento foi realizada por 8 vezes e os resultados utilizados tiveram qualidade phred ≥ 40 .

ATGAGGTCTCAAAAATTCACACTGCTATTACTATCCCTACTACTTTTCTTA
 CCTCTTTTTCTCACAAATTTTA T TACTCCAAATCTCGCA TA GCAGATTC
 ACCAAAGCA AAGTCAAAAAATTGTTGGGTACTTTTCTTCGTGGGGCGTTT
 ACGGACGTAATTATCAAGTTGCTGACATTGATGCATCAAACTTA CTCAC
 CTTAACTATGCTTTCCGCGATATTTGTTGGAATGGAAAACATGGAAACCC
 TTCTACTCATCCTGATAATCCAAATAAACAAACGTG GAACTGTAAAGAAT
 CTGGTGT ACCATTGCAAAAATAAGAGGT CCTAATGGTACTCTCGT ACTC
 GGGGAACCATGGGCTGATGTTACCAAATCGTATCCTGGCTCAGGGACAAC
 TTGGGAAGATTGCGATAAATATGCCCGTTGCGGAAATTTCGGGGAACTAA
 AACGATTAAGCTAAATATCCTCACTTAAAAACAATTATTTCCGTTGGT
 GGCCGGACTTGGTCTAACCGCTTTTCTGATATGGCCGCTGATGAAAAAC
 AAGAAAAGTATTTGCTGAATCTACAGTAGCTTTTCTTCGCGCATATGGGT
 TTGATGGCGTAGATTTAGACTGGGAATATCCGGGCGTTGAAACGATTCCCT
 GGTGGTAGTTATCGTCTGAAGATAAACAAAATTTCACTCTCCTTCTTCA
 AGACGTCCGAAATGCTTTGAATAAAGCAGGTGCTGAAGATGGCAAACAAT
 ATTTACTAAACAATCGCTTCAGGTGCAAGCCAACGCTACGCTGATCATA
 GAACTAAAGAAAATTTCTCAAATACTCGATTGGATTAATATTATGACATA
 TGATTTCCACGGCGGATGGGAAGCTACTTCTAATCATAATGCAGCTCTAT
 ATAAGGATCCAAATGATCCAGCAGCAAAACGAATTTTACGTAGATGGT
 GCTATAAATGTTTATACAAATGAAGGTGTTCCAGTCGATAAACTAGTATT
 AGGCGTACCCTTTTACGGACGTGGCTGGAAAAGTTGTGGCAAAGAAAATA
 ACGGACAATATCAACCTTGCAAACCAGGTAGTGATGGGAAACTTGCTTCT
 AAAGGTACTTGGGATGATTACTCTACCGGTGACACAGGTGTCTATGATTA
 CGGTGATTTAGCAGCCAATTACGTTAATAAAAATGGTTTTGTACGCTACT
 GGAATGACACAGCTAAAGTACCTTACTTATATAATGCAACTACAGGCACA
 TTTATTAGCTACGATGACAATGAATCTATGAAATACAAAACAGACTATAT
 AAAGACGAAAGTTTAAAGTGGAGCAATGTTTTGG GAACTAAGCGGAGATT
 GCGTACAAGTCCAAAATATAGTTGCAGTGGTCCAAAATTACTTGATACG
 CTAGTAAAAGAATTACTTGGTGGACCTATTAATCAAAAAGATACTGAGCC
 ACCAACGA ATGTTAAAAACATTGTAGTTACGAATAAAAATTCAAACTCAG
 TTCAATTAAACTGGACTGCATCTACTGATAACGTAGGAGTTACGGAATAT
 GAAATTACTGCTGGAGAAGAGAAATGGAGTACAACAACAATAGCATTAC
 AATTAAAAACCTTAAAACCTAATACGGAATACAAATTTTCAATAAT TGCCA
 AAGATGCTGCTG GAAATAAATCACAACTACCGCTCTTACTGTCAAAAACG
 GATGAAGCTAATACGACACCT CCTGATGGAAATGGTACRG TACATTTTC
 AGTCACTTCGAATTGGGGCAGCGGTTATAACTTCTCGATTATAATCAAAA
 ATAATGGAACGAACCTATTAAAAATTGGAATTTAGAATTTGATTATAGC
 GGCAATTTAACACAAGTTTGGGATTCTAAAATTAGTAGTAAAACAAATAA
 TCATTATGTAATTACGAACGCAGGATGGAATGGTGAATTCCTCCTGGTG
 GATCTATTACAATTGGCGGTGCAGGAACAGGTAATCCTGCCGAACCTTTA
 AATGCC GTCATTAGCGAAAAC TAG

Figura 5. Sequência completa do gene *chi_1555*, com destaque, para os “primers” utilizados durante o sequenciamento.

A análise bioinformática do gene *chi_1555* indicou que esse gene codifica uma proteína com 674 aminoácidos com massa molecular de 74,24 kDa e ponto isoelétrico de 6,01.

O programa SignalP indica a presença e localização do peptídeo sinal, que geralmente, é encontrado na extremidade N-terminal da proteína, e sua presença na sequência demonstra que a proteína segue uma rota de síntese via retículo endoplasmático e sugere que este inibidor possa seguir para outro compartimento

celular (VIEIRA, 2004). O programa indicou que o peptídeo sinal de Chi_I555 esta entre os aminoácidos 32 e 33 (Figura 6).

Por meio da ferramenta InterPro o sítio ativo da quitinase foi localizado entre os aminoácidos 201 e 209 (FDGVLDWE), e que possui os aminoácidos DXDXDXE conservados nas posições necessárias para a conferir a atividade quitinolítica da enzima (DURAND et al., 2005, IKE, et al., 2006; ROSAS-GARCÍA, 2013) caracterizando-a como pertencente ao grupo de enzimas glicosil hidrolases.

Observou-se também a presença de um domínio ligante de quitina situado entre os aminoácidos das posições 574 e 670 com aminoácidos conservados nas posições W-588, Y-592 e W- 623, como observado na sequência de *chi255* (DRISS, 2005) cuja função é se ligar ao substrato e auxiliar a hidrólise da quitina (SVITI & KIRCHMAN, 1998) e que é observado também em outras quitinases (HASHIMOTO et al., 2000; ROSAS-GARCÍA et al., 2013).

Entre os aminoácidos 481 e 572, foi encontrado um domínio de fribronectina tipo III, também é conservado em outras quitinases (THAMTHIANKUL et al., 2001; BARBOZA-CORONA et al., 2003; DRISS et al., 2005; LIU et al., 2010) e é descrito como um domínio auxiliar da degradação de diferentes tipos de polímeros insolúveis, como quitina, celulose e amido (DRIS, 2005) (Figura 6).

atgagggtctcaaaaattcacactgctattactatccctactacttttcttacctctttt
M R S Q K F T L L L L S L L L F L P L F 20
ctcacaaaattttattactccaaatctcgattagcagattcaccaaaagcaaaagtcaaaaa
L T N F I T P N L A L A D S P K Q S Q K 40
attgttgggtactttctctcggtggggcggttacggacgtaattatcaagttgctgacatt
I V G Y F P S W G V Y G R N Y Q V A D I 60
gatgcatcaaaaacttactcaccttaactatgcttttcgcgatattttgtggaatggaaaa
D A S K L T H L N Y A F A D I C W N G K 80
catggaacccttctactcatcctgataatccaaataaacaacgtggaactgtaaagaa
H G N P S T H P D N P N K Q T W N C K E 100
tctggtgtaccattgcaaaaataaagaggttcctaattggtactctcgtactcggggaacca
S G V P L Q N K E V P N G T L V L G E P 120
tgggctgatgtaccaaatcgatcctggctcagggacaacttgggaagattgcgataaaa
W A D V T K S Y P G S G T T W E D C D K 140
tatgcccttgcggaattttcggggaactaaaacgattaaaagctaaatcctcactta
Y A R C G N F G E L K R L K A K Y P H L 160
aaaacaattatttccgttgggtggcggacttggctcaaccgcttttctgatatggccgct
K T I I S V G G R T W S N R F S D M A A 180
gatgaaaaacaagaaaagattttgctgaactctacagtagcttttctcgcgatatggg
D E K T R K V F A E S T V A F L R A Y G 200
tttgatggcgtagatttagactgggaatatccgggcttgaacgattcctggtgtagt
F D G V D L D W E Y P G V E T I P G G S 220
tatcgtcctgaagataaacaatttctactctccttctcaagacgtccgaaatgctttg
Y R P E D K Q N F T L L L Q D V R N A L 240
aataaagcaggtgctgaagatggcaacaatatttactaacaatcgcttcaggtgcaagc
N K A G A E D G K Q Y L L T I A S G A S 260
caacgctacgtgatcatacagaactaaagaaaatttctcaataactcgattggattaat
Q R Y A D H T E L K K I S Q I L D W I N 280
attatgacatatgattccacggcgatgggaagctacttctaatacataatgagctcta
I M T Y D F H G G W E A T S N H N A A L 300
tataaggatccaaatgatccagcagcaaatatgatttttctgtagatgggtgctataat
Y K D P N D P A A N T N F Y V D G A I N 320
gtttatacaaatgaaggtgtccagtcgataaactagattaggcgtacccttttacgga
V Y T N E G V P V D K L V L G V P F Y G 340
cgtggctgaaaagttgtggcaaaaataacggacaatatcaaccttgcaaacagggt
R G W K S C G K E N N G Q Y Q P C K P G 360
agtgatgggaaacttgccttctaaaggtacttgggatgattactctaccggtgacacaggt
S D G K L A S K G T W D D Y S T G D T G 380
gtctatgattacggtgatttagcagccaattacggttaataaaaatggttttgtacgttac
V Y D Y G D L A A N Y V N K N G F V R Y 400
tggaatgacacagctaaagtaccttacttatataatgcaactacaggcacatttattagc
W N D T A K V P Y L Y N A T T G T F I S 420
tacgatgcaaatgaatctatgaaatacaaacagactatataagacgaaaggtttaagt
Y D D N E S M K Y K T D Y I K T K G L S 440
ggagcaatgttttgggaactaagcggagattgccgtacaagtccaaaatagttgcagt
G A M F F W E L S G D C R T S P K Y S C S 460
ggtcctaaattgatagctagtaaaagaattacttgggtggacctattaatcaaaaa
G P K L L D T L V K E L L G G P I N Q K 480
gatactgagccaccaacgaatgttaaaaacattgtagttacgaataaaaattcaaacctca
D T E P P T N V K N I V V T N K N S N S 500
ttcaataaactggactgcatctactgataacgtaggagttacgggaatgaaattac
V Q L N W T A S T D N V G V T E Y E I T 520
gctggagaagagaaatggagtagacaacaacaatagcattacaattaaaaacttaaaact
A G E E K W S T T T N S I T I K N L K P 540
aatacggatacaaaattttcaataattgccaaagatgctgctggaataaatcaaacct
N T E Y K F S I I A K D A A G N K S Q P 560
accgctcttactgtcaaacggatgaagctaatcagcacctcctgattggaatggtac
T A L T V K T D E A N T T P P D G N G T 580
gctacattttcagtcacttccgaatttggggcagcgggtataacttctcgattataatcaaa
A T F S V T S N W G S G Y N F S I I I K 600
aataatggaacgaaccctattaaaaattggaattagaatttggattatagcggcaattta
N N G T N P I K N W K L E F D Y S G N L 620
acacaagtttgggattctaaaattagtagtaaaacaataatcattatgtaattacgaac
T Q V W D S K I S S K T N N H Y V I T N 640
gcaggatggaatggtgaaattcctcctggtggatctattacaattggcgggtgcaggaaca
A G W N G E I P P G G S I T I G G A G T 660
gtaatcctgcccgaacttttaaatgcccgtcattagcgaaaactag
G N P A E L L N A V I S E N - 674

Figura 6. Sequência de nucleotídeos (minúscula) e de aminoácidos (maiúsculas) da quitinase (Chi_I555) de *B. thuringiensis* isolado I555. Sequência nucleotídica: códon de inicialização de leitura (ATG) – sublinhado simples; códon de finalização de leitura (TAG) – sublinhado duplo. Sequência peptídica: peptídeo sinal – em negrito; sítio ativo da quitinase – sombreado em cinza e letras brancas; domínio de

fibronectina – sombreado em preto; domínio ligante de quitina – sombreado em cinza e letras pretas.

5.4 Análise Filogenética

As sequências foram selecionadas de acordo com a sua classificação em diferentes serovar de *B. thuringiensis*. Estas, mais a sequência de Chi_I555 e os dois grupos externos, foram alinhadas utilizando o software Clustal W (THOMPSON, et al., 1994). A partir deste alinhamento, uma árvore filogenética foi construída pelo método de “Neighbor-Joining”, usando “bootstrap” com 500 repetições, pelo programa Mega 5 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, version 5; KUMAR et al., 2001) para analisar a distância genética entre as sequências (Figura 7).

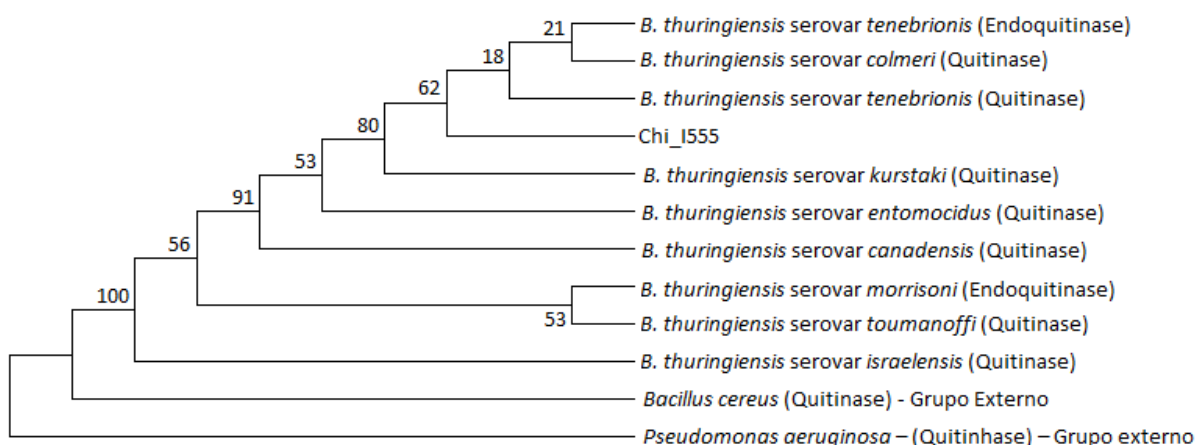


Figura 7. Árvore filogenética construída pelo software Mega 5 a partir de sequências de quitinase de *B. thuringiensis*, utilizando o método “Neighbor-Joining”. Uma análise de “bootstrap” foi feita com 500 repetições.

Pela árvore filogenética construída (Figura 7), pode-se observar que a distância genética entre as quitinases de diferentes variedades de *B. thuringiensis*, é pequena, ou seja, que as mudanças nas bases das sequências destas quitinases são poucas, como pode-se observar também pela pouca variação na identidade quando utilizado o “blastp”, que foi apenas de 99 % - 97 %. Em um estudo de Okay & Özcengiz 2011, observa-se resultados parecidos, com uma endoquitinase de *B. thuringiensis* serovar *morrisoni*. Pela proximidade da distância genética de Chi_I555 com *B. thuringiensis* serovar *tenebrionis*, podemos sugerir que a proteína Chi_I555 teria um potencial maior contra coleópteros, já que *B. thuringiensis* serovar

tenebrionis é uma variedade específica contra esta ordem de insetos (KRIEG et al., 1983).

5.5 Expressão heteróloga e detecção por “Western Blotting” de Chi_I555

O gene *chi_I555*, por ter sido clonado no vetor pET SUMO, o qual tem na porção N-terminal um peptídeo de 6X His e a proteína de fusão SUMO, teve um aumento no peso molecular da proteína recombinante de, aproximadamente 13 kDa, apresentando, portanto, uma massa molecular de 87 kDa (Figura 8A). Devido a presença do peptídeo sinal, a proteína pode estar sendo secretada durante a sua extração, o que pode justificar a pouca expressão da proteína. Estudos futuros podem ser realizados, retirando o peptídeo sinal da sequência, como feito por Barboza-Corona, 2003.

A técnica de Western blotting foi realizada para se detectar a presença da proteína recombinante por meio da ligação do anticorpo anti-His à cauda de polihistidina fusionada à proteína e pode-se observar a banda correspondente à reação do anticorpo contra a proteína recombinante (Figura 8B).

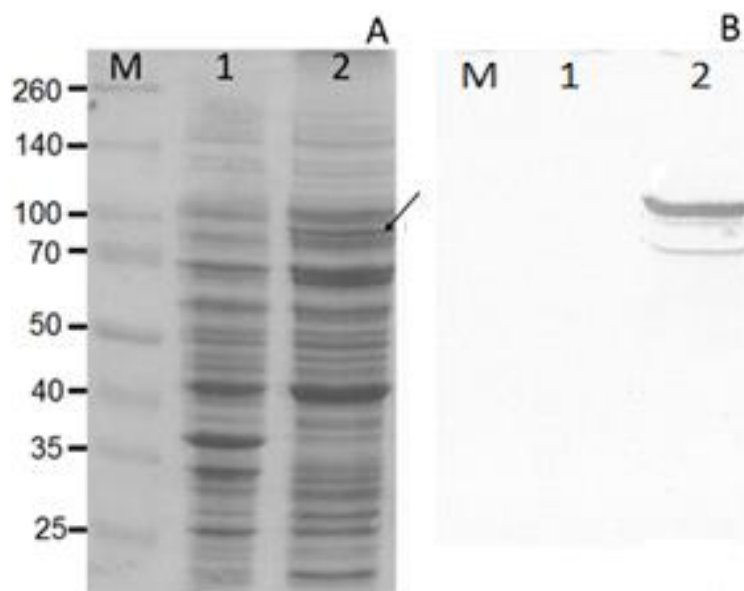


Figura 8. (A) Detecção da proteína recombinante Chi_I555 em gel de SDS-PAGE 10% utilizando Coomassie Blue R. (B) Detecção por “Western blotting” da proteína Chi_I555 utilizando o anticorpo antiHis (GE Healthcare®). 1- Cultura a 22°C por 5 h de células de *E. coli* BL21 contendo o vetor pET SUMO::*chi_I555* sem a indução da expressão de Chi_I555 por IPTG; 2- Cultura a 22°C por 5 h de células de *E. coli*

BL21 contendo o vetor pET SUMO::*chi_I555* após a indução da expressão de *Chi_I555* por 0,5 mM de IPTG. M- marcador de peso molecular (kDa) “Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder” (Thermo Scientific).

5.6 Determinação da atividade quitinolítica e do pH ótimo de *Chi_I555*

Com os valores de absorbância obtidos em cada intervalo de uma hora foi montada uma tabela, e a partir desta, gerado um gráfico com linha de tendência, para verificar se o valor de R^2 seria próximo a 0,99, ou seja, se os dados estarão confiáveis para serem adicionados à fórmula, como realizado no exemplo abaixo (Figura 9). A atividade quitinolítica de *Chi_I555* foi mensurada em pH 7 e indicou um valor de $2,92 \pm 0,22$ U/mL de extrato enzimático.

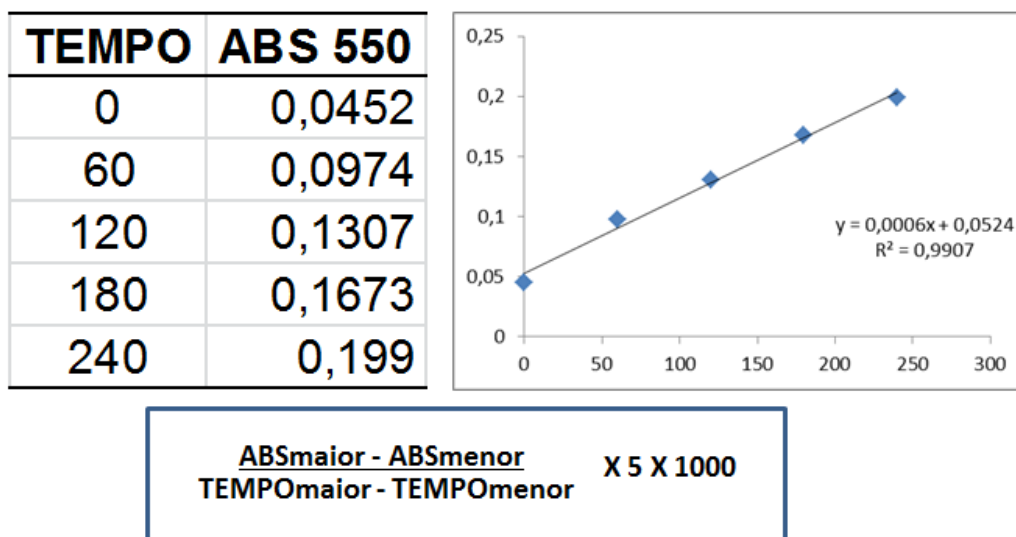


Figura 9. Exemplo da determinação da atividade quitinolítica.

A avaliação da atividade de *Chi_I555* em diferentes pHs, (2,6 a 10,5) (Figura 10), resultou em uma maior atividade quitinolítica entre os valores de pHs neutro 5,4 e 7,0. Em condições alcalinas (pH > 8) e em valores de pH inferiores a 4, a atividade de *Chi_I555* teve uma redução considerável, com valores de atividade abaixo de 40%, condições semelhantes à da quitinase de *B. thuringiensis* ChiA-HD73 (BARBOZA-CORONA, 2008).

Não foi detectada atividade de quitinase no extrato enzimático obtido à partir do cultivo de células cuja expressão de *Chi_I555* não foi induzida.

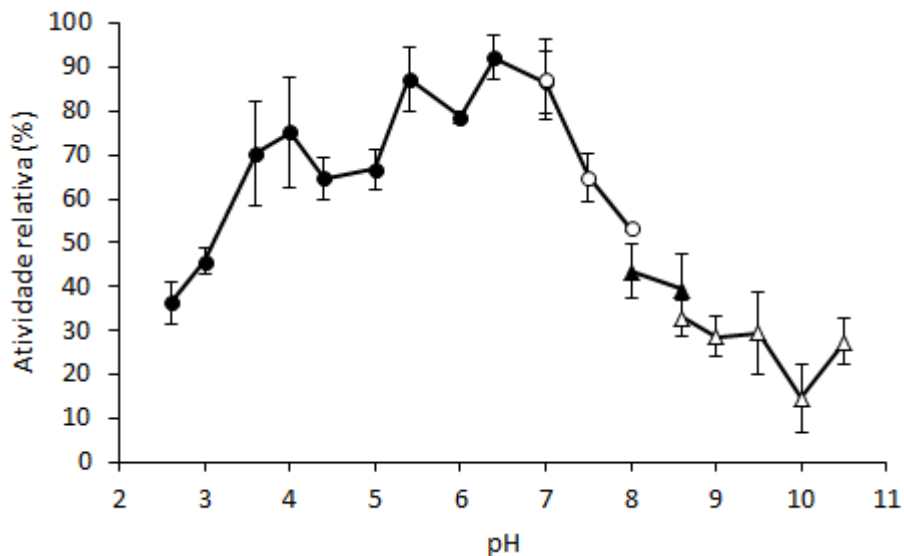


Figura 10. Atividade relativa (%) da quitinase de *B. thuringiensis* I_555 (*chi_I555*) produzida em sistema heterólogo. Tampões utilizados: 200 mM Citrato-fosfato sódico (●), Fosfato de sódio (○), TRIS-HCl (▲), Glicina-NaOH (△). Média ± Erro padrão (n=3).

A produção de quitinases tem atraído a atenção mundial de pesquisadores do mundo acadêmico e da indústria, devido seu amplo espectro de aplicações (VAIDYA et al., 2001; NAWANI et al., 2003; CHAIHARN, 2013). As quitinases de *B. thuringiensis* têm sido utilizadas para explorar o seu efeito de toxicidade contra diferentes pragas agrícolas, podendo ser utilizadas isoladas (THAMTHIANKUL et al., 2001; VEGA et al., 2006), ou em conjunto com outras proteínas inseticidas de *B. thuringiensis* (PARDO-LÓPEZ et al., 2009). Por exemplo, a toxicidade da quitinase isolada e em combinação com a toxina Cry1Ac foi testada por Hu et al. (2009) contra duas espécies de insetos *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) e *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae), embora quitinase tendo apresentado elevada taxa de mortalidade mesmo isolada, houve a potencialização da toxicidade em combinação com Cry para as larvas testadas. Também segundo Regev et al. (1996), a quitinase isolada ou em combinação com a Cry1C apresentou efeito sinérgico contra larvas neonatas de *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) e Downing et al. (2000) também mostrou que o efeito tóxico encontrado foi significativamente aumentado pelo uso da quitinase em combinação com Cry1Ac7. Já o sinergismo com a proteína vegetativa Vip (ARORA et al., 2003), apresentou diminuição de 30% na concentração letal média (CL₅₀) indicando novamente a potencialização da quitinase no controle de larvas *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). Exemplos

de piramidação, inclusão de um gene de quitinase associado ao de outra toxina em um único evento transgênico, também são encontrados, como no caso de Ding et al. (2008), que propôs a construção de plasmídeos recombinantes contendo os genes da toxina Cry1Ac e da quitinase de *B. thuringiensis*, cujo resultados mostraram que a quitinase aumentou a eficácia da toxina Cry no controle de *H. armigera*. Sabe-se que a utilização generalizada de *B. thuringiensis* aumenta a pressão de seleção, o que pode acelerar o desenvolvimento de resistência dos insetos e limitar a utilização em longo prazo desta tecnologia (TABASHINIK et al., 1994), portanto é de grande importância a prospecção de novas proteínas com diferentes modo de ação, que possam atuar no controle de insetos pragas, evitando o surgimento de possível resistência pelos mesmos.

6. CONCLUSÕES

- Os estudos conduzidos neste trabalho permitiram o isolamento e obtenção da sequência do gene *chi_1555*, isolado de *B. thuringiensis*.
- Através de análises de bioinformática foi possível identificar domínios e sítios ativos importantes para sua caracterização.
- A proteína codificada por este gene foi expressa na forma ativa, e sua atividade quitinolítica foi determinada, bem como seu pH ótimo sobre o substrato quitina coloidal.
- A proteína Chi_1555 tem potencial para ser utilizado em futuros estudos como agente de controle biológico contra fungos fitopatogênicos, para expressão em plantas transgênicas, e como agente sinérgico com proteínas inseticidas de *B. thuringiensis* para o controle de insetos-praga.

7. REFERÊNCIAS

- ADRANGI, S.; FARAMARZI, M.A.; SHAHVERDI, A.R.; SEPEHRIZADEH, Z. Purification and characterization of two extracellular endochitinase from *Massilia timonae*. **Carbohydrate Research**. V. 345, n. 3, p. 402-407, 2010.
- Arora, N.; Ahmad, T.; Rajagopal, R.; Bhatnagar, R.K. A constitutively expressed 36 kDa exochitinase from *Bacillus thuringiensis* HD-1. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 307, p. 620–625, 2003.
- AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI JR.; W.; PEREIRA, J. O.; ARAÚJO, W. L.; Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**. Universidad Católica de Valparaíso – Chile, v. 3, n. 1. p. 40-65, 2000.
- BARBOZA-CORONA, J.E., NIETO-MAZZOCCO, E., VELAZQUEZ-ROBLEDO, R., SALCEDO- ARNANDEZ, R., BAUTISTA, M., JIMENEZ, B.; IBARRA, J.E. Cloning, sequencing, and expression of the chitinase gene chiA74 from *Bacillus thuringiensis*. **Appl Environ Microbiol**. V.69, p.1023–1029, 2003.
- BARBOZA-CORONA, J.E.; REYES-RIOS D.M.; SALCEDO-HERNÁNDEZ, R.; BIDESHI, D.K. Molecular and biochemical characterization of an endochitinase (ChiA-HD73) from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73. **Mol Biotechnol**. V.39(1), p. 29-37, 2008.
- BEIER, S.; JONES, C.M.; MOHIT, V.; HALLIN, S. BERTILSSON, S. GLOBAL PHYLOGEOGRAPHY OF CHITINASE Genes in Aquatic Metagenomes. **Applied and Environmental Microbiology**. V. 77 DOI: 10.1128/AEM.01481-10, 2011.
- BERGAMASCO, V. B.; MENDES, D. R. P.; FERNANDES, O. A.; DESIDÉRIO, J. A.; LEMOS, M. V. F. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ia10 and Vip3Aa protein interactions and their toxicity in *Spodoptera* spp. (Lepidoptera). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.112, p. 152–158, 2013.
- BHATTACHARYA, D.; NAGPURE, A.; GUPTA, R.K. Bacterial chitinases: properties and potential. **Critical Rev. Biotechnol**. v. 27, p. 21-28, 2007.
- BOYCE, R.; LENHART, A.; KROEGER, A.; VELAYAUDHAN, R.; ROBERTOS, B.; HORSTICK, O. *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) for the control of dengue vectors: systematic literature review. **Tropical Medicine and International Health**. V. 18 no5 p.564–577, 2013.
- BORGOGNONI, C. F.; POLAKIEWICZ, B. e PITOMBO, R. N. M. Estabilidade de emulsões de d-limoneno em quitosana modificada. **Ciência e Tecnologia Alimentar**, v. 26, n. 3, p. 502-508, 2006.
- BRAVO, A.; SARABIA, S.; LOPEZ, L.; ONTIVEROS, H.; ABARCA, C.; ORTIZ, A.; ORTIZ, M.; LINA, L.; VILLA-LOBOS, F. J.; GUADALUPE, P.; NUNEZ-VALDEZ, M. E.; SOBERÓN, M.; QUINTERO, R.; Characterization of *cry* genes in mexican

Bacillus thuringiensis strain collection. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 64, n. 12, p. 4965 - 4972, 1998.

BRAVO, A.; GILL, S.S.; SOBERÓN, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**. 49 (4):423-35, 2007.

BRAVO, A.; LIKITVIVATANAVONG, S.; GILL, S.S.; SOBERÓN, M. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. **Insect Biochem Mol Biol**. v. 41, p. 423-431, 2011.

BRÉVAULT T, HEUBERGER S, ZHANG M, ELLERS-KIRK C, NI X, MASSON L, LI X, et al. Potential shortfall of pyramided transgenic cotton for insect resistance management. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**. 110:5806–5811, 2013.

CHAIHARN, M.; LUMYONG, S.; HASAN, N.; PLIKOMOL, A. Solid-state cultivation of *Bacillus thuringiensis* R 176 with shrimp shells and rice straw as a substrate for chitinase production. **Ann Microbiol**. V.63, p. 443-450, 2013.

CECI, L., M. VOLPICELLA, Y. RAHBE, R. GALLERANI, J. BEEKWILDER., 2003 Selection by phage display of a variant mustard trypsin inhibitor toxic against aphids. **Plant J**. 33: 557–566

COSTA, E.L.N.; LUCHO, A.P.R.; FRITZ, L.L.; FIUZA, L.M. Artrópodes e bactérias entomopatogênicos. (2009) **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento** - nº 38. 2009. Disponível em: <<http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio38/ecologia.pdf>> Acesso em: 10 de maio 2014.

CRIALESI-LEGORI, P. C. B.; DAVOLOS, C. C.; LEMES, A. R. N.; MARUCCI, S. C.; LEMOS, M. V. F.; FERNANDES, O. A.; DESIDÉRIO, J. A. Interação de proteínas Cry1 e Vip3A de *Bacillus thuringiensis* para controle de lepidópteros-praga. **Pesq. agropec. bras., Brasília**. v.49, n.2, p.79-87, 2014.

DING, X.Z.; LUO, Z.H.; XIA, L.Q.; GAO, B.; SUN, Y.J.; ZHANG, Y.M. Improving the insecticidal activity by expression of a recombinant cry1Ac gene with chitinase-encoding gene in acrySTALLIFEROUS *Bacillus thuringiensis*. **Curr Microbiol**. v. 56, n. 5, p. 442–446, 2008.

DOWNING, K.J.; LESLIE, G.; THOMSON, J.A. Biocontrol of the Sugarcane Borer *Eldana saccharina* by Expression of the *Bacillus thuringiensis cry1Ac7* and *Serratia marcescens chiA* Genes in Sugarcane-Associated Bacteria. **Appl. Environ. Microbiol**. v. 66, n. 7, p. 2804-2810, 2000.

DRISS, F., KALLASSY-AWAD, M., ZOUARI, N., JAOUA, S. Molecular characterization of a novel chitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. Kurstaki. **Journal of applied microbiology**. v. 99, p. 944-953, 2005.

DRISS, F.; ROUIS, S.; AZZOUZ, H.; TOUNSI, S.; ZOUARI, N.; JAOUA, S. (2010) Integration of a recombinant chitinase into *Bacillus thuringiensis* parasporal insecticidal crystal. **Curr. Microbiol.** v. 62, n. 1, p. 281–288, 2010.

DURAND, A.; HUGHUES, B.; ROUSSEL, A.; FLATMAN, R.; HENRISSAT, JUGE, N. Emergency of a subfamily of xylanase inhibitors within glycoside hydrolase family 18. **FEBS Journal.** V. 272, p1745–1755, 2005.

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

ESTRUCH, J.J.; CAROZZI, N.B.; DESAN, N.; WARREN, G.W.; KOZIEL, M.G. Transgenic plants: na emerging approach to pest control. **Nature Biotechnology**: 15, p. 137-141, 1997.

FANG, S.; WANG, L.; GUO, W.; ZHANG, X.; PENG, D.; LUO, C.; YU, Z.; SUN, M. *Bacillus thuringiensis* Bel Protein Enhances the Toxicity of Cry1Ac Protein to *Helicoverpa armigera* Larvae by Degrading Insect Intestinal Mucin. **Applied and Environmental Microbiology.** V. 75 (16): 5237, 2009.

FEKETE, C.; WESZELY, T. HORNOK, L. Assignment of a PCR-amplified chitinase sequence cloned from *Trichoderma hamatum* to resolved chromosomes of potential biocontrol species of *Trichoderma*. **Microbiology Letters.** V. 145, p. 385-391, 2006.

FUNKHOUSER, J.D.; ARONSON, N.N. Chitinase family GH18: evolutionary insights from the genomic history of a diverse protein family. **BMC Evol Biol.** v. 7, p.96, 2007.

Gill, S.S.; Cowles, E.A.; Pietrantonio, P.V. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. **Annu. Rev. Entomol.** 37; 615-36, 1992.

GILL, S.S. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* toxins. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.90, n.1, p. 69-74, 1995.

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

GUNNING, R. V.; MOORES, G. D.; DEVONSHIRE, A. L. Esterase inhibitors synergise the toxicity of pyrethroids in Australian *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). **Pesticide Biochemistry and Physiology**: 63, p. 50-62, 1999.

GUPTA, S. AND A.K. DIKSHIT. Biopesticides: An ecofriendly approach for pest control. **Journal of Biopesticides.** v.3, p.186 – 188, 2010.

HASHIMOTO, M.; IKEGAMI, T.; SEINO, S.; OHUCHI, N.; FUKADA, H.; SUGIYAMA, J.; SHIRAKAWA, M.; WATANABE, T. Expression and Characterization of the Chitin-

Binding Domain of Chitinase A1 from *Bacillus circulans* WL-12. **Journal of Bacteriology**. P. 3045-3054, 2000.

HOELL, I.A.; KLEMSDAL, S.J. VINCENT, G.H. Overexpression and characterization of a novel chitinase from *Trichoderma atroviride* strain P1. **Biochim. Biophys. Acta**. v. 1748, p. 180-190, 2005.

HU, S.B.; LIU, P.; DING, X.Z.; YAN, L.; SUN, Y.J.; ZHANG, Y.M.; LI, W.P.; XIA, L.Q. Efficient constitutive expression of chitinase in the mother cell of *Bacillus thuringiensis* and its potential to enhance the toxicity of Cry1Ac protoxin. **Appl Microbiol Biotechnol**. v. 82, n. 6, p. 1157–1167, 2009.

IKE, M.; NAGAMATSU, K.; SHIOYA, A.; NOGAWA, M.; OGASAWARA, W. OKADA, H.; MORIKAWA, Y. Purification, characterization, and gene cloning of 46 kDa chitinase (Chi46) from *Trichoderma reesei* PC-3-7 and its expression in *Escherichia coli*. **Appl Microbiol Biotechnol**. V. 71(3):294-303, 2006.

KAWASE, T.; YOKOKAWA, S.; SAITO, A.; FUJII, T.; NIKAIDOU, N.; MIYASHITA, K.; WATANABE, T. Comparison of enzymatic and antifungal properties between family 18 and 19 chitinases from *S. coelicolor* A3(2). **Biosci Biotech Biochem**. v. 70, p. 988–998, 2006.

Kleter, G., et al. 2007. Altered pesticide use on transgenic crops and the associated general impact from an environmental perspective. **Pest Management Science**, 63: 1107 -1115, 2007.

KUMAR, S.; TAMURA, K. & NEI, M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics** 5:150-163, 2004.

LIU, D.; CAI, J.; CHI-CHU, X.; LIU, C.; CHEN, Y. Purification and partial characterization of a 36-kDa chitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. *colmeri*, and its biocontrol potential. **Enzyme and Microbial Technology**. V.46, p. 252–256, 2010.

LOC, N.T. TINJUANGIUN, P.; GATEHOUSE, A. M. R.; Liner transgene constructus lacking vector lacking backbone sequences generate transgenic rice plants with accumulate higher levels of proteins conferring insect resistance. **Molecular Breeding**, 9: 231-244, 2002

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

MATSUMOTO, K. S. Fungal chitinases. IN: *Advances in Agricultural and Food Biotechnology*, 289-304. ISBN: 81- 7736-269-0 Editors: Ramón Gerardo Guevara-González and Irineo Torres-Pacheco.

MERZENDORFER, H.; ZIMOGH, L. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. **J. Exp. Biol.** v. 206, p. 412–4393, 2003.

NAWANI, N.N.; KAPADNIS, B.P. Chitin degrading potential of bacteria from extreme and moderate environment. **Indian J. Exp. Biol.** V.41(3), p. 248-54, 2003.

OKAY, S.; ÖZCENGİZ, G. Molecular cloning, characterization, and homologous expression of an endochitinase gene from *Bacillus thuringiensis* serovar morrisoni. **Turk J Biol.** V.35 p.1-7, 2011.

PALMA, L.; ESCUDERO, I.R.; MAEZTU, M.; CABALLERO, P.; MUÑOZ, D. Screening of *vip* genes from a Spanish *Bacillus thuringiensis* collection and characterization of two Vip3 proteins highly toxic to five lepidopteran crop pests. **Biological Control.** V.66, p.141-149, 2013.

PARDO-LÓPEZ, L.; MUNOZ-GARAY, H.; PORTA, H.; RODRÍGUEZ-ALMAZÁN, C.; SOBERÓN, M. BRAVO, A. Strategies to improve the insecticidal activity of Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. **Peptides.** V. 30, p.589-595, 2009.

PATIL, S.R.; GHORMADE, V.; DESHPANDE, M.V. Chitinolytic enzymes: na exploration. **Enzyme and Microbial Technology.** v. 26, p. 473-783, 2000.

PIETRANTONIO; P.V.; FEDERICI, B.A.; GILL, S.S. Interaction of *Bacillus thuringiensis* endotoxins with the insect midgut epithelium. In: THOMPSON, S.N.; FEDERICI, B.A. (Ed.) **Parasites and pathogens of insects.** New York: Academic Press, 1993. v.2, cap.3, p.55-79.

PRASANA, L.; EIJSINK, V.G.H.; MEADOW, R.; GASEIDNES, S. A novel strain of *Brevibacillus laterosporus* produces chitinases that contribute to its biocontrol potential. **Applied Microbiology and Biotechnology.** V.97, p. 1601-1611, 2013.

PURDUE, M.P.; HOPPIN, J.A.; BLAIR, A.; DOSEMECI, M.; ALAVANJA, M.C.R. Occupational exposure to organochlorine insecticides and cancer incidence in the Agricultural Health Study. **International Journal of Cancer** v. 120, p. 642-649, 2007.

RAMIREZ, M.G.; AVELIZAPA, L.I.R.; AVELIZAPA, N.G.R.; CAMARILLO, R.C. Colloidal chitin stained with Remazol Brilliant Blues RR, a useful substrate to select chitinolytic microorganisms and to evaluate chitinases. **Journal of Microbiological Methods,** Amsterdam, v.56, n.2, p. 213-219, 2004.

RAMÍREZ-LEPE, M.; RAMÍREZ-SUERO, M. Biological Control of Mosquito Larvae by *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis*. **Insecticides – Pest Engineering.** Dr. Farzana Perveen (Ed.), ISBN: 978-953-307-895-3, InTech, Disponivel em: <http://www.intechopen.com/books/insecticides-pest-engineering/biologicalcontrol-of-mosquito-larvae-by-bacillus-thuringiensis-subsp-israelensis>. Acesso em: 10 de maio 2014.

RANDHAWA, G.J.; SINGH, M.; GROVER, M. Bioinformatic analysis for allergenicity assessment of *Bacillus thuringiensis* Cry proteins expressed in insect-resistant food crops. **Food Chem Toxicol** v. 49, p. 356–362, 2011.

RAYMOND, B.; JOHNSTON, P.R.; NIELSEN-LEROUX, C.; LERECLUS, D.; CRICKMORE, N. *Bacillus thuringiensis*: an important pathogen? **Trends Microbiol.** v. 18, p. 189-194, 2010.

REGEV, A.; KELLER, M.; STRIZHOV, N.; SHEN, B.; PRUDOVSKY, E.; CHET, I.; GINZBERG, I.; KONCZ-KALMAN, Z.; KONCZ, C.; SCHELL, J.; ZILBERSTEIN, A. Synergistic activity of a *Bacillus thuringiensis* d-endotoxin and a bacterial endochitinase against *Spodoptera littoralis* larvae. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 62, p. 3581-3386, 1996.

ROSAS-GARCÍA, M.A.; FORTUNA-GONZÁLEZ, J.M.; BARBOZA-CORONA, J.E. Characterization of the chitinase gene in *Bacillus thuringiensis* Mexican isolates. **Folia Microbiol.** V. 58, p.483–490, 2013.

SALMA, U.; UDDOWLA, M.H.; KIM, M.; KIM, J.M.; KIM, B.K; BAEK, H.; PARK, H.; MYKLES, D.L.; KIM, H. Five hepatopancreatic and one epidermal chitinases from a pandalid shrimp (*Pandalopsis japonica*): Cloning and effects of eyestalk ablation on gene expression. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part B. v. 161, p. 197–207, 2012.

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

SCHNEPF, H.E.; TOMCZAK, K.; ORTEGA, J.P. and WHITELEY, H.R. Specificity-determining Regions of a Lepidopteran-specific Insecticidal Protein Produced by *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Biological Chemistry*, September 1990, vol. 265, no. 34, p. 20923-20930, 1998.

SEIDL, V. Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions. **Fungal Biol Rev.** v. 22, p. 36–42, 2008.

SVITI, A.L.; KIRCHMAN, D.L. A chitin-binding domain in a marine bacterial chitinase and other microbial chitinases: implications for the ecology and evolution of 1,4- β -glycanases. **Microbiology.** V.144, p. 1299-1308, 1998.

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

TABASHNIK, B.E.; BIGGS, R.W.; HIGGINSON, D.M.; HENDERSON, S.; UNNITHAN, D.C.; UNNITHAN, G.C.; ELLERS-KIRK, C.; SISTERTON, M.S.; DENNEHY, T.J.; CARRIÈRE, Y.; MORIN, S. Association between resistance to Bt cotton and cadherin genotype in Pink bollworm. **Journal of Economic Entomology**, v. 98, p. 635–644, 2005.

THAMTHIANKUL, S.; SUAN-NGAY, S.; TANTIMAVANICH, S.; PANBANGRED, W. Chitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. *pakistani*. **Appl Microbiol Biotechnol.** V. 56(3-4), p.395-401, 2001.

THOMPSON JD, HIGGINS DG, GIBSON TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res.** 22, 4673-4680, 1994.

TOWBIN, H.; STAETHETIN, A.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, V.76, p.4350-4354, 1979. DOI: 10.1073/pnas.76.9.4350.

USHARANI, T. R.; GOWDA, T.K.S. (2011) Cloning of chitinase gene from *Bacillus thuringiensis*. **Indian Journal of Biotechnology.** V. 10, p. 264-269, 2011.

VAECK, M.; REYNAERTS, A.; HOFTE, H.; JANSSENS, S.; BEUCKELEER, M.; DEAN, C.; ZABEAU, M.; MONTAGU, M.V.; LEEMANS, J. Transgenic plants protected from insect attack. *Nature.* v. 328, p. 33-37, 1987.

VAIDYA, R.J.; SHAH, I.M.; VYAS, P.R.; CHHATPAR, H.S. Production of chitinase and its optimization from a novel isolate *Alcaligenes xylosoxydans*: potential in antifungal biocontrol. **World J. Microbiol. Biotechnol.** V.17, p.691-696, 2001.

VEGA, L.M.; BARBOZA-CORONA, J.E.; AGUILAR-USCANGA, M.G.; RAMÍREZ-LEPE, M. Purification and characterization of an exochitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* and its action against phytopathogenic fungi. **Canadian Journal Of Microbiology.** V. 52 (7), p. 651-657, 2006.

VITERBO, A.; RAMOT, O.; CHERNIN, L.; CHET, I. Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* spp. in the biocontrol of fungal plant pathogens. **Kluwer Academic Publishers.** v.81, p. 549-556, 2002.

WANG, G.; MANNS, D.C.; CHUREY, J.J.; WOROBO, R.W. Homologous expression system development and the systematic site-directed mutagenesis analysis of thurincin H, a bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* SF361. **Applied and Environmental Microbiology.** V. 80 DOI: 10.1128/AEM,00433-14, 2014.

WATKINS, P.R.; HUESING, J.E.; MARGAM, V.; MURDOCK, L.L.; HIGGINS, T.J.V. Insects, nematodes, and other pests. **Plant Biotechnology and Agriculture.** p. 353-370, 2012.

YU, X.; LIU, T.; SUN, Z.; GUAN, P.; ZHU, J.; WNG, S.; LI, S.; DENG, Q.; WANG, L.; ZHENG, A.; LI, P. Co-expression and Synergism Analysis of Vip3Aa29 and Cyt2Aa3 Insecticidal Proteins from *Bacillus thuringiensis*. **Curr. Microbiol.** v.64, p. 326-331, 2012.