

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

**ESTUDO DA ATIVIDADE DE PROTEÍNAS Cry,
DERIVADAS DE *Bacillus thuringiensis* ATIVAS PARA
INSETOS-PRAGA DO ALGODOEIRO**

ÉRICA SOARES MARTINS

Orientador: Dr. Bergmann Morais Ribeiro
Co-Orientadora: Dr.^a Rose Gomes Monnerat

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Biologia Molecular.

Brasília, 16 de Julho de 2009

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

**ESTUDO DA ATIVIDADE DE PROTEÍNAS Cry,
DERIVADAS DE *Bacillus thuringiensis* ATIVAS PARA
INSETOS-PRAGA DO ALGODOEIRO.**

ÉRICA SOARES MARTINS

Orientador: Dr. Bergmann Moraes Ribeiro

Co-Orientadora: Dr.^a Rose Gomes Monnerat

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Biologia Molecular.

Brasília, 16 de Julho de 2009

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos “.

Isaac Newton

*"Aos meus queridos pais, Alonso e Edna,
que alimentaram cérebro e coração,
e ao Paulo, que cuida muito bem de ambos".*

Dedico

AGRADECIMENTOS

Considerando esta Tese como resultado de uma caminhada que não começou na UnB e na Embrapa, agradecer pode não ser tarefa fácil, nem justa. Para não correr o risco da injustiça, agradeço de antemão a todos que de alguma forma passaram pela minha vida e contribuíram para a construção de quem sou hoje.

Agradeço em primeiro lugar a DEUS, pela oportunidade e pelo privilégio que me foram dados em compartilhar tamanha experiência. O que seria de mim sem a fé que eu tenho nele!

A minha família, pelo constante respaldo, cujo amor, apoio e união me armaram de valor para fazer esta travessia.

Aos meus pais, Alonso e Edna, por serem meu porto seguro, meu guia, meus amigos. Muito obrigada por serem as pessoas maravilhosas que vocês são. Muito obrigada por tudo, tudo, tudo.

Aos meus irmãos, Marlos, Kênia e Shirley, por serem essas pessoas lindas que sei que posso contar a qualquer momento, por sua doçura, carinho, sensibilidade. Obrigada pelo apoio incondicional.

Ao Leo, que mesmo tão pequenino, me dá motivos mais que suficientes para continuar.

Ao Marlon, Gierck e Glória, pelas bobagens que falamos sempre que estamos juntos, que me faz esquecer da verdadeira responsabilidade da vida.

À querida Conceição, minha segunda mãe, por sua graciosidade e carinho em estar sempre por perto quando preciso.

Ao Toinho e a Ritinha, obrigada pelo carinho, pelas risadas, pelo apoio e incentivo. Ao meu orientador, Dr. Bergmann Morais Ribeiro, pela amizade, confiança e orientação durante todo o desenvolvimento deste trabalho

A Dr.^a Rose Monnerat, por estes nove anos de convívio, aprendizado e amizade. Pela confiança no meu trabalho e por acreditar que eu podia ser mais, minha gratidão e admiração por tão competente mestre. Hoje posso dizer que sou uma pesquisadora por sua

causa. Muito, muito obrigada! “Se eu vi mais longe, foi por estar de pé sobre ombros de gigantes”.

A todos meus queridos colegas do Laboratório de Bactérias Entomopatogênicas (Embrapa) e de Microscopia Eletrônica (UnB), mas em especial a Lílian, Viviane, Felipe, Guilherme, Aline, Anabele, Maria, Raimundo, Gláucia, Shélida, Bruno, Roberto, Carol e Murilo pelo companheirismo, amizade, e pelas boas idéias e frases filosóficas que davam significado ao trabalho do dia a dia.

Ao Vinícius, meu fiel escudeiro, não sei nem como agradecer por sua paciência e amizade, você vai longe!

A Aninha, que sempre esteve disposta a me ajudar nos procedimentos de microscopia. Ao professor Carlos André, Miguel e Rayner pelas análises em gel 2D.

A todos colegas e funcionários do Prédio de Controle Biológico, em especial ao Willian, Zilda, Luciana, Débora, Helinho, Izabela, Dudu e Fábio pela ajuda indispensável e sincera amizade.

A Dr.^a Alejandra Bravo, pela oportunidade de aprendizado e pela receptividade em seu laboratório. E a todos os colegas do laboratório da Dr.^a Alejandra, em especial ao Jorge, pela paciência e dedicação, Obrigada!

Aos meus amigos queridos Déia, Katy e Pablo, pela amizade e anos de convivência, que ajudaram a me tornar um ser humano melhor.

A querida amiga Luzia, sem você e seus conselhos o caminho teria sido muito mais árduo.

A Ana (Secretária da Pós-graduação) por sua paciência e dedicação.

Aos membros da banca pela disponibilidade em contribuir com o nosso trabalho.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), pela bolsa a mim concedida.

E por último, mas nunca em último, o meu agradecimento mais especial, ao Paulo, com quem compartilhei todos estes anos de doutorado, fora os do mestrado... Seu apoio incondicional e seu companheirismo incansável foram fundamentais para realização deste trabalho. Obrigada por ser esta pessoa maravilhosa, por todo amor, carinho e compreensão e por estar comigo nos momentos alegres e também nos difíceis. Essa vitória é nossa! Te amo!

A todos meu mais profundo agradecimento.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	V
ÍNDICE	VII
LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE TABELAS	XIII
ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	XIV
RESUMO	XVI
ABSTRACT	XVII
INTRODUÇÃO	18
CAPÍTULO I	21
1 – Cotonicultura	21
1.1 – Principais Pragas do Algodoeiro.....	22
1.2 – Cultivares geneticamente modificadas	25
2 – <i>Bacillus thuringiensis</i>	26
2.1 – Toxinas produzidas por <i>Bacillus thuringiensis</i>	27
2.2 – Regulação da expressão dos genes <i>cry</i>	42
3 – Sistemas de Expressão de Proteínas Cry	45
3.1 – Expressão heteróloga em <i>Escherichia coli</i>	46
3.2 – Expressão homóloga em <i>Bacillus thuringiensis</i>	46
4 – Proteínas Cry com atividade para <i>Anthonomus grandis</i> e <i>Spodoptera frugiperda</i>	46
4.1 – CryII.....	46
4.2 – Cry10	47
4.3 – Cry1B	48
OBJETIVOS	49
CAPÍTULO II	50

1. Introdução	50
2. Materiais e Métodos	51
2.1 – Estirpes:	51
2.2 – Insetos:.....	52
2.3 – Bioensaio	53
2.4 – Obtenção dos perfis protéicos.....	55
2.5 - Obtenção do perfil molecular das estirpes.....	56
2.6 – Caracterização morfológica por microscopia eletrônica de varredura (MEV)	59
2.7 – Detecção de β -exotoxina produzida por <i>B. thuringiensis</i>	59
3. Resultados	60
3.1 – Bioensaios.....	60
3.2 – Análise do perfil protéico dos cristais das estirpes selecionadas	64
3.3 – Análise do perfil molecular das estirpes selecionadas	65
3.4 – Caracterização morfológica por microscopia eletrônica de varredura (MEV)	70
3.5 – Detecção de β - exotoxina nas estirpes tóxicas a <i>A. grandis</i>	72
4. Discussão	72
 CAPÍTULO III	 75
1 – Introdução	75
2 – Materiais e Métodos	77
2.1 – Clonagem e seqüenciamento do gene <i>cry1Ba</i>	77
2.2 – Clonagem do gene <i>cry1Ba6</i> em vetor de expressão para <i>B. thuringiensis</i>	77
2.3 – Análise da expressão da proteína recombinante Cry1Ba6	78
2.4 – Análise ultraestrutural dos cristais da proteína Cry1Ba6	79
2.5 – Bioensaio com a proteína recombinante Cry1Ba6.....	79
2.6 – Eletroforese Bidimensional (2D-E)	80
2.7 – Espectrometria de Massas.....	80
2.8 – Preparação de BBMV de <i>A. grandis</i>	81
2.9 – Biotinilação das proteínas	82
2.10 – Ensaio de ligação	82
2.11 – Purificação de proteínas ancoradas a GPI que se ligam a Cry1Ba6.....	83
2.12 – Detecção de atividade específica de ALP (fosfatase alcalina) e APN (aminopeptidase).....	83
2.13 – Análise ultraestrutural de intestinos de <i>A. grandis</i> incubados com a proteína recombinante Cry1Ba	84
3 – Resultados	85
3.1 – Clonagem e seqüenciamento do gene <i>cry1B</i> da estirpe S601	85
3.2 – Expressão de proteína recombinante Cry1Ba6 em <i>B. thuringiensis</i>	90
3.3 – Ensaio de toxicidade da proteína recombinante Cry1Ba6 para <i>A. grandis</i>	92
3.4 – Perfil bidimensional e espectrometria de massa de proteínas da estirpe S601	93
3.5 – Ensaio de ligação e de competição homóloga	94
3.5 – Análise de proteínas ancoradas a GPI que interagem com Cry1Ba6.....	95
3.6 – Análise ultraestrutural do intestino médio de larvas de <i>A. grandis</i> incubadas com a proteína Cry1Ba6 recombinante marcada	97
4 – Discussão	99
 CAPÍTULO IV	 103

1. Introdução	103
2. Materiais e Métodos	104
2.1 – Clonagem dos genes <i>cryIIa</i> e <i>cry10</i> em vetores de expressão para <i>B. thuringiensis</i>	104
2.2 – Análise da expressão de proteínas Cry expressas em <i>B. thuringiensis</i>	109
2.3 – Bioensaio com a proteína recombinante	110
2.4 – Caracterização morfológica dos cristais produzidos pelas estirpes recombinantes	111
2.5 – Ensaio de ligação de proteínas Cry recombinantes a BBMV de <i>A. grandis</i> e <i>S. frugiperda</i>	111
3 – Resultados	114
3.1 – Construção dos plasmídeos pGemP <i>cryIIa</i> e pHTP <i>cryIIa</i>	114
3.2 – Construção do plasmídeos pSVP <i>cry10A</i>	117
3.3 – Análise da expressão da proteína CryIIa expressa em <i>B. thuringiensis</i>	118
3.4 – Bioensaio com a proteína recombinante	120
3.5 – Microscopia eletrônica de varredura.....	121
3.6 – Ensaio de ligação de proteínas Cry recombinantes a BBMV de <i>A. grandis</i> e <i>S. frugiperda</i>	122
4. Discussão	125
 PERSPECTIVAS FUTURAS	 131
 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	 132
 ANEXOS	 158

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1: Estádios de desenvolvimento de *A. grandis*.
- Figura 1.2: Larvas de *S. frugiperda*.
- Figura 1.3: Morfologia de *B. thuringiensis*.
- Figura 1.4: Alinhamento da estrutura primária das toxinas Cry.
- Figura 1.5: Representação esquemática das estruturas das toxinas Cry1Aa, Cry2A e Cry3A
- Figura 1.6: Esquema das seqüências de proteínas Cry e seus sítios de clivagem proteolítica
- Figura 1.7: Receptores moleculares da proteína Cry1A.
- Figura 1.8: Esquema do modo de ação de toxinas Cry1A para lepidópteros proposto por Bravo *et al.*, 2007
- Figura 1.9: Esquema do modo de ação de toxinas Cry1A, proposto por Zhang *et al*, 2005.
- Figura 1.10: Esquema do modo de Ação de toxinas Cry1A, proposto por Jurat Fuentes e Adang, 2006
- Figura 2.1: Ilustração da criação de *A. grandis*.
- Figura 2.2: Perfil protéico das estirpes selecionadas de *B. thuringiensis*.
- Figura 2.3: Análise dos produtos de PCR obtidos para o gene *cry1B*
- Figura 2.4: Análise dos produtos de PCR obtidos para o gene *cry4A*
- Figura 2.5: Análise dos produtos de PCR obtidos para o gene *cry4B*.
- Figura 2.6: Análise dos produtos de PCR obtidos para o gene *cry10*
- Figura 2.7: Análise dos produtos de PCR obtidos para o gene *cry11*
- Figura 2.8: Análise dos produtos de PCR obtidos para o gene *cyt1*
- Figura 2.9: Análise dos produtos de PCR obtidos para o gene *cyt2*.
- Figura 2.10: Análise dos produtos de PCR obtidos para o gene *cry1Ab*
- Figura 2.11: Análise dos produtos de PCR obtidos para o gene *cry11*.
- Figura 2.12: Análise dos produtos de PCR obtidos para o gene *cry8*
- Figura 2.13: Análise dos produtos de PCR obtidos para o gene *cry2*
- Figura 2.14: Caracterização morfológica, por MEV
- Figura 3.1: Amplificação por PCR do gene *cry1B* da estirpe S601 de *B. thuringiensis*.
- Figura 3.2: Análise do gene *cry1B* clonado da estirpe de *B. thuringiensis* S601.
- Figura 3.3: Sequencia de nucleotídeos completa do gene *cry1Ba* clonado da estirpe S601

Figura 3.4: Predição da estrutura tridimensional da proteína Cry1Ba6 da estirpe S601

Figura 3.5: Análise do gene *cry1B* clonado em *B. thuringiensis*.

Figure 3.6: Análise da expressão de proteína pela estirpe recombinante de *B. thuringiensis* em gel de SDS-PAGE a 12%.

Figura 3.7: Análise ultraestrutural da mistura esporo/cristal da estirpe recombinante BtCry1Ba6.

Figura 3.8: Perfil bidimensional de proteínas dos cristais purificados da estirpe S601.

Figura 3.9: Ensaio de competição homóloga entre vesículas de microvilosidade intestinal (BBMVs) isoladas de *A. grandis* com a toxina recombinante Cry1Ba6.

Figura 3.10: Caracterização de proteínas ancoradas a GPI de BBMVs de *A. grandis*, envolvidas na ligação à toxina Cry1Ba6.

Figura 3.11: Detecção da ligação da toxina Cry1Ba6 as microvilosidades intestinais de *A. grandis*.

Figura 3.12: Detecção de ligação específica da toxina Cry1Ba6 às microvilosidades intestinais de *A. grandis*.

Figura 4.1: Esquema de amplificação e clonagem do gene *cryIIa*.

Figura 4.2: Mapa físico do plasmídeo pHT315.

Figura 4.3: Amplificação da região promotora do gene codificante da proteína Cry49Aa de *B. sphaericus* e do gene *cryIIa* para *overlap* PCR.

Figura 4.4: *Overlap* PCR P + *cryIIa*.

Figura 4.5: Confirmação da clonagem do cassete gênico Promotor+*cryIIa*.

Figura 4.6: Confirmação da transformação do plasmídeo pHTP*cryIIa* em *E. coli*.

Figura 4.7: Confirmação da transformação do plasmídeo pHTP*cryIIa* em *B. thuringiensis*.

Figura 4.8: Construção do plasmídeo pSVP*cry10A*.

Figura 4.9: Confirmação da clonagem do plasmídeo pSVP*cry10A* em *B. thuringiensis*.

Figura 4.10: Análise da expressão da proteína Cry1Ia

Figura 4.11: Análise da expressão da proteína Cry10A.

Figura 4.13: Biotinilação das proteínas Cry1Ia, Cry10 e Poliedrina expressas em baculovírus

Figura 4.14: Biotinilação das proteínas Cry1Ia e Cry10A expressas em Bt

Figura 4.15: Ensaio de ligação à BBMV de *A. grandis* e *S. frugiperda* com proteínas derivadas de células de inseto infectadas por baculovírus.

Figura 4.16: Ensaio de ligação a BBMV de *A. grandis* e *S. frugiperda* com proteínas derivadas de *B. thuringiensis*.

Figura 5.1: Esquema da atividade de proteínas Cry expressas em plantas de algodão.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1: Receptores para proteínas Cry.

Tabela 2.1: Concentração final da mistura esporo/cristal das estirpes usadas no bioensaio de dose-resposta para análise de atividade tóxica para *A. grandis*.

Tabela 2.2: Características dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR para caracterização dos genes *cry*.

Tabela 2.3: Resultados de bioensaio seletivo de estirpes de *B. thuringiensis* contra larvas neonatas de *A. grandis* a partir de uma dose diagnóstica.

Tabela 2.4: Concentração letal (CL₅₀) das estirpes de *B. thuringiensis* contra *A. grandis*.

Tabela 3.1: Bioensaio contra *A. grandis* usando a proteína Cry1Ba6 expressa em *B. thuringiensis*.

Tabela 3.2: Detecção da atividade específica das enzimas ALP e APN em amostras de BBMV de *A. grandis*.

Tabela 4.1: Resultado de bioensaios contra *A. grandis* utilizando as proteínas Cry1Ia e Cry10 recombinantes expressas em Bt.

Tabela 4.2: Resultado de bioensaios contra *S. frugiperda* utilizando as proteínas Cry1Ia e Cry10 expressas em Bt.

ABREVIATURAS e SÍMBOLOS

ALP	fosfatase alcalina
Amp ⁺	resistente a ampicilina
APN	Aminopeptidase
BBMV	“ <i>brush-border membrane vesicle</i> ” - vesículas da borda escovada da membrana de células do intestino
BSA	albumina sérica bovina
Bti	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i>
Btk	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i>
Btt	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>thuringiensis</i>
CADR	prteína caderina
CLO ⁺	resistente a cloranfenicol
DNA	ácido desoxirribonucléico
DTT	ditiotreitól
dH ₂ O	água destilada
dNTP	deoxinucleotídeos
EDTA	ácido etilenodiamino tetracético
EGTA	ácido etileno glicol tetracético
ERM ⁺	resistente a eritromicina
g	grama
GCR	receptor glicoconjugado
GPI	glicosil fosfatidil inositol
x g	velocidade de sedimentação em unidade gravitacional
h	hora
HCl	ácido clorídrico
HEPES	ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2'-etanosulfônico
IPTG	isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo
kb	quilobase = 1000 pares de base
KCl	cloreto de potássio
kDa	quilodalton
MES	ácido 2-(N-Morfolino) etanosulfônico

m/m	massa/massa
m/v	massa/volume
mg	miligrama
µg	micrograma = 10^{-6} grama
mL	mililitro
µL	microlitro = 10^{-6} litro
min	minuto
NaCl	cloreto de sódio
NaOH	hidróxido de sódio
ng	nanograma = 10^{-9} grama
nL	nanolitro = 10^{-9} litro
pb	pares de base
pH	potencial de hidrogênio
PIPLC	fosfolipase C
PMSF	fenilmetilsulfonil fluoride
RNA	ácido ribonucléico
RNAse	ribonuclease
rpm	rotação por minuto
s	segundo
SDS	dodecilsulfato de sódio
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturado com SDS
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil etilenodiamina
Tris	tris (hidroximetil) aminometano
U	unidade enzimática
v/v	volume/volume
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D- galactopiranosídeo
°C	grau Celsius

RESUMO

Toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis* (Bt) são proteínas inseticidas utilizadas para controle de insetos. Elas agem por ingestão e são ativadas por proteases e interagem com receptores específicos localizados na superfície da célula hospedeira, resultando na lise de células do intestino médio. Este trabalho está dividido em quatro capítulos. No primeiro, foi feita uma revisão sobre *Bacillus*, ecologia e modo de ação, e insetos-praga do algodão. O segundo capítulo descreve a seleção e o estudo do conteúdo de genes *cry* de estirpes de *B. thuringiensis* com atividade para *Anthonomus grandis*. O terceiro capítulo descreve a clonagem, sequenciamento e expressão da toxina Cry1Ba da estirpe S601 de *B. thuringiensis*, que é tóxica para *A. grandis*. A ligação da toxina Cry1Ba6 a proteínas localizadas na borda escovada de células do intestino médio de *A. grandis* foi analisada e descobriu-se que a proteína Cry1Ba6 se liga a duas proteínas (62 e 65 kDa) com atividade de fosfatase alcalina (ALP). Este trabalho é o primeiro relato da localização de receptores de toxina Cry em células do intestino médio de *A. grandis*. Finalmente, o capítulo quatro mostra como outras toxinas (Cry1Ia e Cry10A) expressas em Bt, com atividade já descrita para *A. grandis* interagem com BBMV's de *A. grandis* e *S. frugiperda*.

ABSTRACT

Cry toxins from *Bacillus thuringiensis* (Bt) are insecticidal proteins used for insect control. They act by ingestion and are activated by host proteases and interact with specific receptors located on the host cell surface, resulting in midgut epithelial cells lysis. This work is divided in four chapters. In the first, a review was done on *Bacillus*, ecology and action mode, and cotton insect-pests. The second chapter describes the selection and study of the content of *cry* genes of *B. thuringiensis* strains with activity against *Anthonomus grandis*. The third chapter describes cloning, sequencing and expression of a *cry1Ba* toxin gene from the *B. thuringiensis* S601 strain which is toxic to *A. grandis*. The binding of Cry1Ba6 toxin to proteins located on the midgut brush border membrane of *A. grandis* was analyzed and it was found that Cry1Ba6 binds to two proteins (62 and 65 kDa) that showed alkaline phosphatase (ALP) activity. This work is the first report that shows the localization of Cry toxin receptors on the midgut cells of *A. grandis*. Finally, the chapter four shows how other toxins (Cry1Ia and Cry10A) expressed in Bt, which previously had activity described to *A. grandis*, interact with *A. grandis* and *S. frugiperda* BBMV.

INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores consumidores de agrotóxicos do mundo. Gasta, anualmente, cerca de 2,5 bilhões de dólares nessas compras. Infelizmente, pouco se faz para controlar os impactos sobre a saúde dos que produzem e dos que consomem os alimentos impregnados por essas substâncias.

O uso descontrolado, a propaganda massiva, o medo de perda de produtividade da safra, a cultura do “fruto bonito é aquele que as pessoas gostam de comprar”, a não utilização de equipamentos de proteção e o pouco conhecimento dos riscos, são alguns dos responsáveis pela intoxicação dos trabalhadores rurais.

Vários estudos feitos com trabalhadores demonstraram que há relação entre a exposição crônica a agrotóxicos e doenças, principalmente do sistema nervoso (central e periférico). Além disso, também ocorrem episódios de intoxicação aguda, colocando em risco a vida dos trabalhadores rurais.

A fiscalização no campo está voltada mais à comercialização dos agrotóxicos. Há pouca ou quase não existe vigilância nem orientação para sua correta aplicação. Acontece até do trabalhador utilizar um coquetel de produtos semanalmente, de forma “preventiva”. Ou usar o mesmo princípio ativo de marcas distintas na mesma aplicação.

Os riscos não se limitam ao homem do campo. Os resíduos das aplicações atingem os mananciais de água e o solo. Além disso, os alimentos comercializados nas cidades podem apresentar resíduos tóxicos (Peres, 2001).

A importância dada ao controle de pragas e o aumento da consciência da população para os efeitos diretos e indiretos dos pesticidas, na saúde pública e no ambiente em geral, têm demandado a utilização de novas formas de controle de pragas, que sejam mais econômicas e menos danosas ao meio ambiente.

Alternativas biológicas, por meio do emprego de microrganismos, vêm assumindo uma posição de destaque dentre as alternativas que visam o controle de insetos-praga. A disponibilidade de microrganismos com atividade entomopatogênica é muito ampla, fornecendo uma grande variedade de matéria-prima para o desenvolvimento de novos

produtos com maior patogenicidade e espectro de ação, com direcionamento para produção industrial ou a incorporação de genes que codificam proteínas de ação inseticidas em plantas para obtenção de resistência da mesma às pragas. Por meio dessas estratégias é possível reduzir, a níveis toleráveis, populações de pragas agrícolas de interesse econômico (Perlak *et al.*, 1990). Segundo Secchi (2002), os bioinseticidas, por serem mais seletivos, mais seguros ao aplicador e por não poluírem o meio ambiente, como os agrotóxicos, são uma alternativa verdadeiramente sustentável, que contribui para manter o equilíbrio biológico.

Entre os agentes microbianos, com atividade entomopatogênica, destaca-se o *Bacillus thuringiensis* (Bt), que é uma bactéria aeróbia, Gram positiva, da família Bacillaceae caracterizada pela produção, no momento de sua esporulação, de inclusões protéicas cristalinas, que são tóxicas para vários grupos de insetos (Feiltelson *et al.*, 1992). Estas proteínas são produzidas sob forma de protoxinas, sendo transformadas em peptídeos tóxicos, no intestino do inseto pela ação do pH alcalino intestinal e de proteases. A proteína ativada causa lise das células epiteliais e a morte das larvas (Aronson *et al.*, 1986).

Uma das vantagens da utilização de *B. thuringiensis* é sua especificidade aos insetos sensíveis à ação de suas toxinas. Desta forma, esta bactéria não possui efeito poluente ao meio ambiente, pois é inócua aos mamíferos, outros invertebrados e às plantas (Whiteley e Schnepf, 1986; OMS, 1987). Experimentos *in vivo*, nos quais se administram altas doses de proteínas Cry a outros organismos, que não insetos, não têm demonstrado nenhuma alteração na atividade metabólica dos mesmos, comprovando sua inocuidade aos demais organismos (Shimada *et al.*, 2003).

Em todo o mundo, são procuradas novas estirpes de *B. thuringiensis* visando o aumento do número de toxinas disponíveis para o controle de insetos. A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia possui em torno de 2300 estirpes de *B. thuringiensis* que estão armazenadas no banco de *Bacillus* entomopatogênicos (Monnerat *et al.*, 2001). Todas estas estirpes estão sendo testadas e caracterizadas contra insetos-praga e vetores de doenças para serem utilizadas como base para produção de bioinseticidas, ou como doadoras de genes codificadores de proteínas inseticidas, que poderão ser utilizados na obtenção de cultivares resistentes a insetos.

Insetos como *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) ou lagarta do cartucho-do-milho, são passíveis de controle por meio de bioinseticidas, pois suas larvas se alimentam de folhas que podem ser tratadas com microrganismos, tais como o *B. thuringiensis*. Outros como o *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae) ou bicudo do algodoeiro, não o são, pois é um inseto endófago, sendo que suas larvas se desenvolvem dentro dos botões florais. Os adultos se alimentam principalmente de pólen e furam o botão floral para depositar os ovos. Os danos causados por esta praga, ocasionam uma drástica redução da produtividade.

Uma alternativa para o controle de insetos como o bicudo, é o uso de cultivares transgênicas. O *B. thuringiensis* é um candidato natural como fonte de genes de resistência a insetos, reduzindo o uso excessivo de agrotóxicos que causam poluição e contaminação do ambiente e do agricultor (Monnerat *et al.*, 2001).

CAPÍTULO I

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original”. (Albert Einstein)

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 – Cotonicultura

As primeiras referências históricas do algodão vêm de muitos séculos antes de Cristo. Em escavações arqueológicas nas ruínas de Mohenjo-Daro, no Paquistão, foram encontrados vestígios de tela e cordão de algodão com mais de 5.000 anos (Ballaminut *et al.*, 2006).

A cotonicultura é uma das culturas de maior interesse econômico, em nível mundial. Na década de 90, o algodão superava o preço de outros produtos também importantes como a soja, milho e trigo (Ponchio, 2001). Na indústria têxtil, a fibra do algodão é reconhecida como a mais importante e de maior valor de mercado. O algodoeiro é a planta de aproveitamento mais completo e a que oferece a mais variada gama de produtos de utilização universal (Ballaminut *et al.*, 2006).

Esta planta é cultivada em mais de 60 países no mundo, somente cinco deles, China, Índia, Paquistão, Estados Unidos e Uzbequistão, dividem 75% da produção, 71% da área e 70% do consumo. Os cinco maiores produtores têm sido os mesmos por décadas, apesar da produção e do consumo terem variado bastante entre eles (Farias, 2005).

Foram produzidas aproximadamente 24,7 milhões de toneladas de algodão durante a safra 2006/07, 94.000 toneladas a menos que em 2005/06. Enquanto a produção na maioria dos principais países produtores deve permanecer inalterada na próxima safra, os Estados Unidos esperam uma redução de 14% da área plantada para a safra 2006/07.

A cotonicultura contribui significativamente com a economia brasileira, tendo sua cultura espalhada por todas as regiões do país e, até 2005, correspondia a uma área de 1.151.800 hectares (Farias, 2005).

Segundos dados levantados pela CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento), para safra de 2008/2009 espera-se obter um rendimento de 3,7 toneladas por hectare de algodão em caroço.

1.1 – Principais Pragas do Algodoeiro

O algodoeiro é atacado por um complexo de artrópodes, incluindo pulgões, percevejos, mosca-branca, brocas, lagartas, ácaros e outras espécies de menor importância. Entre os insetos-praga mais danosos à cultura, encontra-se o bicudo do algodoeiro, *Anthonomus grandis* (Boheman, 1883) (Coleoptera: Curculionidae) (Miranda, 2006).

1.1.1 – *Anthonomus grandis* (Bicudo do algodoeiro)

O bicudo do algodoeiro (Fig. 1.1) é considerado a principal e, mais estudada, praga dos algodoeiros nas Américas e no mundo (Busoli *et al.*, 1994; Gallo *et al.*, 2002). Este inseto foi introduzido no Brasil no início da década de 80. Logo após seu estabelecimento, favorecido pelas condições do clima tropical, a lavoura algodoeira gerou prejuízos crescentes não só para os agricultores, mas também para todos os segmentos da cadeia produtiva dependente dessa fibra e de seus produtos (dos Santos 2003).

O bicudo encontra-se distribuído pelos Estados Unidos, México, América Central, Cuba, Haiti, Venezuela, Colômbia, Argentina, Paraguai, África, China e Brasil, possuindo elevado poder de destruição, devido à sua alta capacidade reprodutiva e às numerosas gerações em um ciclo agrícola (Toledo *et al.*, 2000). *A. grandis* é um inseto da ordem Coleoptera, família Curculionidae, que se alimenta de pólen. Sem esse substrato, as fêmeas não conseguem desenvolver seus ovos, precisando, dessa maneira, de plantas no estágio reprodutivo (Gallo *et al.*, 1988). Este inseto possui uma extraordinária capacidade de reprodução podendo produzir de três a sete gerações no ciclo normal da cultura (Lloyd, 1986; Assunção, 1987), dependendo das condições de umidade e temperatura, sendo considerado desta forma, uma das pragas mais dinâmicas de que se tem conhecimento. Isto significa que, de 50 bicudos que entram em diapausa, espera-se uma população de 500.000 adultos ao fim da próxima safra. Com isso, caso os restos de cultivo não sejam destruídos, o número de sobreviventes para a próxima estação pode, no mínimo, duplicar (Barbosa *et al.*, 1983). Além disso, tem alta mobilidade e alta tolerância a seus inimigos naturais (Bradley Junior e Phillips, 1978).

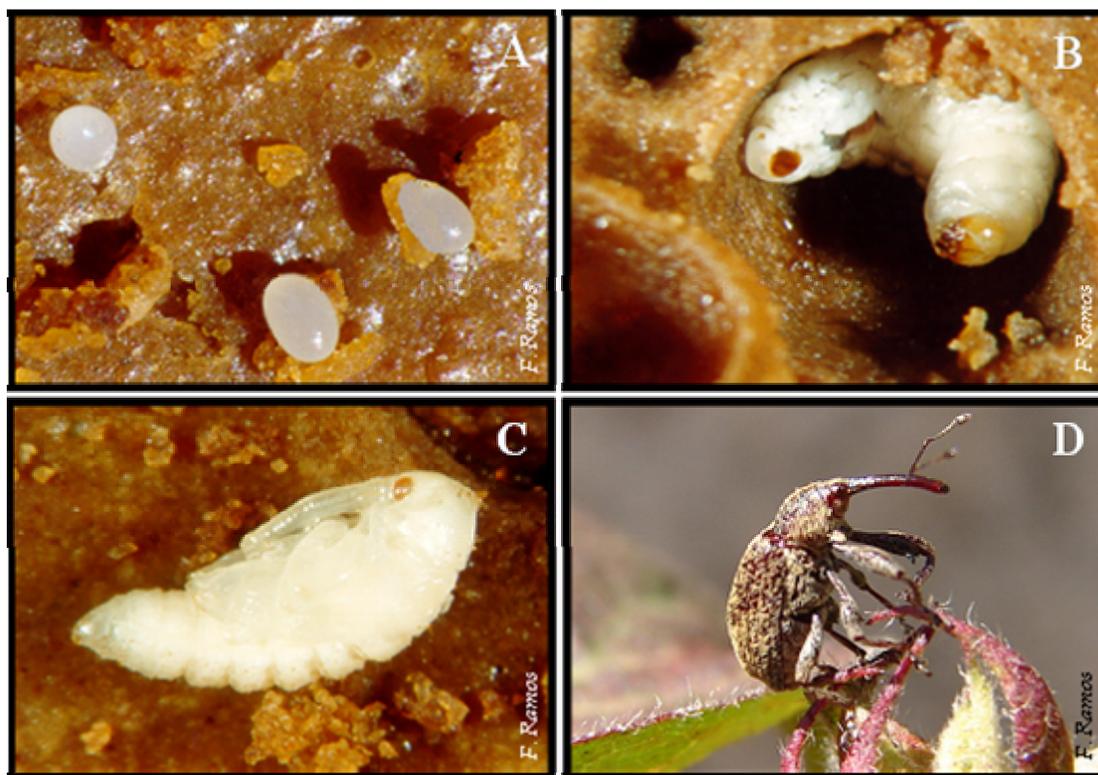


Figura 1.1: Estádios de desenvolvimento de *A. grandis*. A, ovos; B, larva de quarto instar; C, pupa; D, inseto adulto.

O controle efetivo deste inseto é feito através do uso massivo de inseticidas químicos (Wolfenberger *et al.*, 1997). A inexistência de cultivares de algodão resistentes e o alto custo dos inseticidas para o controle do bicudo refletiram significativamente na economia das comunidades agrícolas, em especial os pequenos e médios agricultores que tinham na lavoura algodoeira um dos componentes de sua estrutura agrícola (dos Santos, 2003).

Várias formas de controle vêm sendo pesquisadas e utilizadas com o intuito de minimizar os efeitos danosos da perda de produção. Entre as mais utilizadas, cita-se o uso de defensivos químicos, que embora oneroso e de grande impacto ao meio ambiente, tem apresentado maior eficácia no controle do bicudo. (Wolfenberger *et al.*, 1997). Outros métodos de controle são: o uso de feromônios e plantio-isca (Gallo *et al.*, 2002), uso de variedades precoces de rápida frutificação e maturação (Silvie *et al.*, 2001), catação e destruição dos botões florais (Silvie *et al.*, 2001), controle biológico (Silva *et al.*, 2002) e manejo integrado (Carvalho *et al.*, 2001).

1.1.2 – *Spodoptera frugiperda* (Lagarta do cartucho-do-milho)

Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae) (Fig. 1.2) é uma espécie polífaga que ataca diversas culturas economicamente importantes em vários países. No Brasil, este inseto pode atacar as seguintes culturas: milho, sorgo, arroz, trigo, alfafa, feijão, amendoim, tomate, algodão, batata, repolho, espinafre, abóbora e couve (Cruz *et al.*, 1999; Montesbravo, 2001).

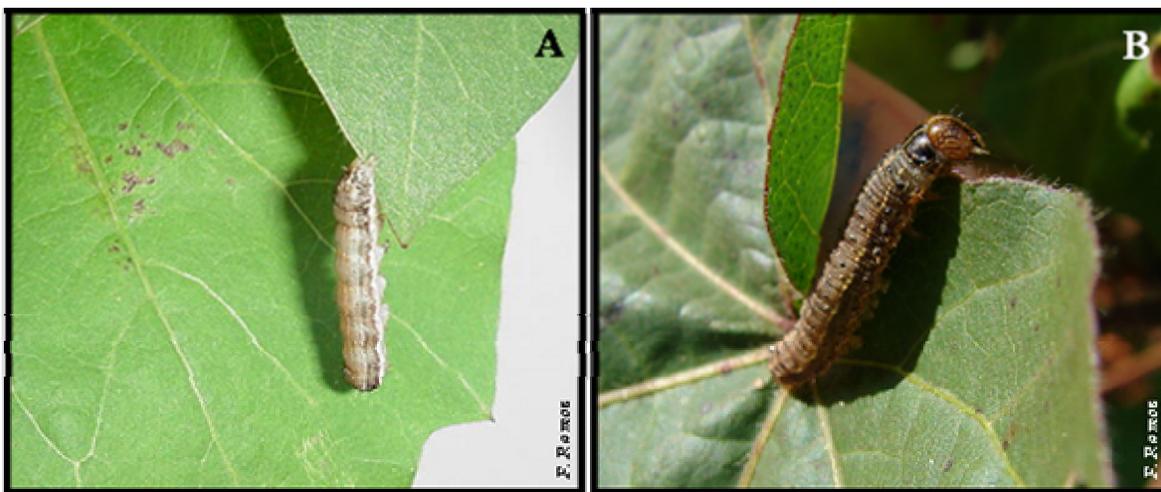


Figura 1.2: Larvas de *S. frugiperda*. A, larva de terceiro instar; B, larva de quinto instar .

A importância econômica da lagarta-militar na cultura do algodoeiro tem crescido a cada ano, principalmente nas áreas agrícolas do Cerrado Brasileiro, onde ataques severos podem reduzir de forma significativa a produção. As causas deste aumento populacional envolvem condições climáticas favoráveis (alta temperatura e baixa umidade relativa do ar), uso excessivo e inadequado de inseticidas, em especial do grupo dos piretróides e, principalmente, a sucessão de cultura ou o plantio próximo ou, ainda, em sucessão a gramíneas como milho, milheto e sorgo (Miranda, 2006).

Na atualidade, se conhecem diferentes espécies de microrganismos entomopatogênicos com potencialidade para serem usados em programas de controle de *S. frugiperda*. Entre eles estão bactérias, fungos, vírus e nematóides (Gardner e Fuxa, 1980; Melo e Azevedo, 2000). A maioria destes entomopatogênicos tem maior eficiência, se aplicados sobre os primeiros estágios larvais. Os entomopatogênicos mais estudados nas

condições do Brasil, para o combate de *S. frugiperda* são *Bacillus thuringiensis* Berliner, e o fungo *Nomurea rileyi* (Farlow) Smason.

1.2 – Cultivares geneticamente modificadas

Nos últimos 20 anos, grupos de pesquisas em todo o mundo vêm tentando conseguir através de melhoramento tradicional, cultivares de algodão resistentes ao bicudo, porém os resultados obtidos não são significativos para solucionar este problema. Uma nova perspectiva tem surgido com a possibilidade de obtenção de algodão transgênico, contendo gene ou genes de resistência ao bicudo. Uma das principais vantagens do algodão transgênico é a redução de insumos químicos para o estabelecimento da lavoura. A adoção de algodão Bt pelos agricultores do México e EUA contribuiu para redução de 50% nas aplicações de inseticidas, na Argentina a redução do uso de inseticidas alcançou 65% (James, 2002).

No ano de 2005, foram plantados cerca de 90 milhões de hectares de culturas geneticamente modificadas (GM). Essas culturas transgênicas foram cultivadas por cerca de 8,5 milhões de fazendeiros em 21 países. Em 2004, a área global estimada das lavouras GM autorizadas foi de 81,0 milhões de hectares, mais que os 67,7 milhões de hectares registrados em 2003.

O Brasil teve um aumento de 4,4 milhões de hectares plantados com lavouras transgênicas (saiu de cinco milhões de hectares em 2004 para 9,4 milhões de hectares em 2005). Dos 35 milhões de hectares colhidos com algodão no mundo, 28% desse total, ou 9,8 milhões de hectares, foram colhidos com culturas transgênicas (Ballaminut, 2007).

De acordo com o relatório de acompanhamento de safra da CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento), a área cultivada com algodão na safra 2008/09 foi de 852,6 mil hectares, 20,9% menor do que a área cultivada em 2007/08 que foi de 1.077,4 mil hectares.

No Brasil a primeira cultivar de algodão Bt liberada comercialmente foi a Bollgard® evento 531 (contendo a proteína Cry1Ac), que obteve a liberação comercial, após aprovação do parecer técnico da CTNBio n.º 0513/2005 - Algodão BT, seguindo a Instrução Normativa CTNBio n.º 10, de 19.02.98 e a lei n.º 11.105 de biossegurança.

Recentemente, em março de 2009, foi liberado o uso comercial da cultivar de algodão WideStrike, evento 281-24-236/3006-210-23 (contendo as proteínas Cry1Ac e Cry1F), da Dow AgroSciences, que obteve a liberação comercial, após aprovação do parecer técnico da CTNBio n.º 1757/2009. E em maio deste mesmo ano, foi liberado o uso comercial da cultivar Algodão Bollgard II, evento MON 15985 (Contendo as proteínas Cry1Ac e Cry2Ab2), também da empresa Monsanto, que obteve a liberação comercial, após aprovação do parecer técnico da CTNBio n.º 1832/2009.

2 – *Bacillus thuringiensis*

B. thuringiensis (Bt) (Fig. 1.3) é uma bactéria de solo, aeróbia, Gram positiva, da família *Bacillaceae*, pertencente ao complexo *B. cereus*, que se caracteriza pela produção de inclusões protéicas cristalinas no momento de sua esporulação durante a fase estacionária do ciclo de crescimento. É uma bactéria de ocorrência ubíqua (Krywunczyk e Fast, 1980), em vários substratos como solo, água, superfície de plantas, insetos mortos, teias de aranha e grãos armazenados (Bravo *et al.*, 1998).

A atividade entomopatogênica desta bactéria se deve à presença das inclusões protéicas cristalinas (Fig. 1.3 A e B), produzidas durante a esporulação. Esses cristais compostos por proteínas denominadas δ -endotoxinas ou proteínas Cry podem ser visualizados por microscopia de luz com contraste de fases (Bravo *et al.*, 1998; Monnerat e Bravo, 2000).

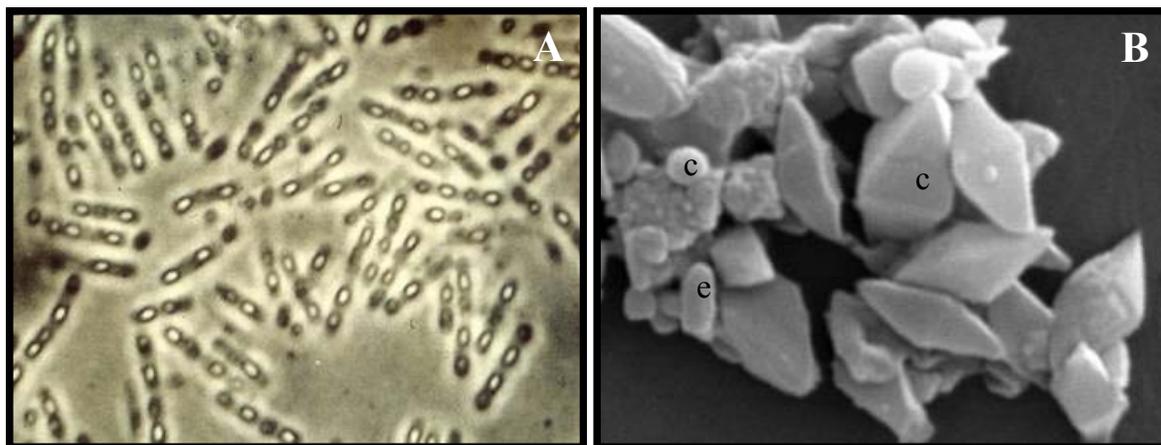


Figura 1.3: Morfologia de *B. thuringiensis*. A – Microscopia de contraste de fases de *B. thuringiensis* (1.000X). B – Microscopia eletrônica de varredura de *B. thuringiensis* mostrando: (c) cristais; (e) esporo (15.000X).

Mais de 350 genes *cry*, que codificam as proteínas Cry, já foram seqüenciados e as proteínas Cry estão classificadas em 58 grupos organizados em diferentes subgrupos, além de dois grupos de toxinas Cyt. Estas proteínas são agrupadas em função do grau de identidade de seus aminoácidos. A atualização constante desses dados pode ser visualizada via Internet no endereço: http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore. (Crickmore *et al.*, 1998).

2.1 – Toxinas produzidas por *Bacillus thuringiensis*

Além das proteínas Cry, *B. thuringiensis* pode produzir várias outras toxinas, incluindo proteínas com atividade inseticida como a α -exotoxina, β -exotoxina, hemolisinas, enterotoxinas, quitinases e fosfolipases (Hansen e Salamitou, 2000). Por outro lado, o esporo também pode contribuir para a patogenicidade, através da ação sinérgica com as proteínas Cry (Johnson e McGaughey, 1996). Todos esses fatores podem contribuir para a patogenicidade da toxina Cry em condições naturais, mas a exata contribuição desses fatores ainda não é totalmente conhecida.

2.1.1 - α -exotoxina

A α -exotoxina, também conhecida como fosfolipase C, lecitinase ou fosfatidilcolina fosfohidrolase, é uma enzima que possui atividade citolítica, atuando sobre os fosfolipídios que formam as membranas celulares (Faust e Bulla Jr., 1982). Esta toxina é termolábil, solúvel em água, altamente tóxica para alguns insetos através da administração oral ou intra-hemocélica. Também é tóxica para ratos e outros vertebrados, causando degeneração e lise de células como, por exemplo, hemócitos (Krieg, 1971; Hansen e Salamitou, 2000).

2.1.2 - β -exotoxina

Também conhecidas como Thuringiensinas, as β -exotoxinas, são termoestáveis, produzidas durante a fase vegetativa e secretadas no meio de cultura. Existem dois tipos de β -exotoxinas. A toxina tipo I é um análogo do ATP, sendo composta de adenina, ribose, glicose e ácido fosfoalárico, apresentando massa molecular de 701 Daltons (Farkas *et al.*, 1969). Esta toxina atua inibindo a ação da RNA polimerase, através da competição pelo

ATP, sendo altamente tóxica para várias ordens de insetos, ácaros, nematóides e também vertebrados, com efeitos teratogênicos e mutagênicos (Hansen e Salamiou, 2000). A β -exotoxina do tipo II é um análogo do UTP e apresenta toxicidade superior à do tipo I, principalmente para coleópteros (Levinson *et al.*, 1990). Os genes responsáveis pela síntese de β -exotoxinas estão localizados em plasmídeos de 75 ou 110 MDa (Levinson *et al.*, 1990).

2.1.3 - Vip3A

As protoxinas “Vip” (do inglês: *vegetative insecticidal proteins*), são proteínas produzidas e secretadas pelas células bacterianas durante a fase vegetativa e de esporulação (Estruch *et al.*, 1996). Estas demonstram ação sobre um espectro maior de espécies de insetos-praga quando comparadas a muitas proteínas Cry, mas principalmente contra larvas de lepidópteros (Loguercio *et al.*, 2002). As Vip foram excluídas da nomenclatura Cry por não formarem cristais protéicos. Os genes responsáveis pela síntese das proteínas Vip estão localizados em plasmídeos de alta massa molecular, juntamente com os genes *cry* (Estruch *et al.*, 1996). O gene *vip3A* codifica uma proteína de aproximadamente 88 kDa, que tem apresentado atividade tóxica para diversos insetos da ordem Lepidoptera, tais como *Agrotis ipsilon*, *S. frugiperda*, *S. exigua* e *Helicoverpa zea*. Em concentrações letais, a Vip3A causa paralisia e lise das células epiteliais do intestino médio dos insetos, sendo que as manifestações físicas da intoxicação pela Vip3A lembram aquelas das proteínas Cry (Yu *et al.*, 1997).

As Vip são produzidas em etapas iniciais do processo de crescimento das bactérias em cultura, antecipando, assim, sua obtenção. Essa foi uma descoberta importante, pois, atualmente, não só se aproveita a mistura de esporos e cristais obtidos após o cultivo de *B. thuringiensis*, como também é possível utilizar o seu sobrenadante (Monnerat e Bravo, 2000).

2.1.4 - δ -endotoxinas (proteínas Cry e Cyt)

As δ -endotoxinas – também denominadas proteínas Cry e Cyt, pertencem a uma classe de proteínas bacterianas conhecidas como toxinas formadoras de poros (TFP), que são solúveis em água, permitindo modificações conformacionais para permitir a inserção ou

o translocamento destas proteínas na membrana celular do hospedeiro. Existem dois grupos de TFP: (1) α -hélice toxinas, no qual, a região de α -hélice forma um poro através da membrana e (2) β -barril toxinas, que se inserem na membrana formando um β -barril composto de monômeros de grampos de folhas β -pregueadas (Parker e Feil, 2005 citado por Bravo *et al.*, 2007).

A maioria das estirpes de *B. thuringiensis* pode sintetizar mais de um tipo de cristal. Os cristais podem ser formados por diferentes proteínas Cry, podendo haver casos em que cinco toxinas são encontradas. A massa molecular dessas toxinas pode variar entre 30 e 142 kDa. O processo de formação desse cristal está ligado à esporulação, uma vez que estudos de cristalografia mostraram que o cristal é formado a partir do segundo estágio de esporulação, e é liberado no momento em que as células são lisadas (Monnerat e Bravo, 2000). O cristal pode ser bipiramidal, cubóide, rombóide, ovóide, esférico ou, ainda, sem forma definida (Habib e Andrade, 1998).

Dentre as estirpes de *B. thuringiensis*, algumas apresentam um único gene codificador das proteínas Cry. Outras estirpes apresentam cinco genes diferentes, como é o caso da subespécie *aizawai* HD-137 e subespécie *israelensis*. Esta última apresentou cinco genes codificadores de proteínas Cry e um outro gene que codifica uma citolisina, todos localizados em um único plasmídeo de 72MDa (Bourgouin *et al.*, 1988).

Interações complexas como hidrofobicidade, pontes de hidrogênio e, principalmente, pontes dissulfeto, mantêm as proteínas juntas e estáveis na inclusão parasporal (Gill *et al.*, 1992). Segundo Höfte e Whiteley (1989), pontes dissulfeto na região C-terminal estão relacionadas com a manutenção da estrutura, com as propriedades de solubilidade dos cristais e com a conservação das sequências de aminoácidos nesta região devendo permitir a agregação de diferentes proteínas no mesmo cristal.

O alinhamento das sequências de aminoácidos permite uma visão das relações evolucionárias entre as diferentes classes de proteínas Cry, revelando a presença de cinco blocos de sequências conservadas, o que sugere que eles sejam importantes para a função biológica dessas proteínas, principalmente por se localizarem nas regiões internas da proteína e na região de contato entre domínios, também permite dizer que as proteínas Cry formam uma família com blocos similares e mecanismos de ação muito semelhantes

(Monnerat e Bravo, 2000). Na Figura 1.4 são apresentados os grupos da família dessas toxinas, organizados de acordo com a identidade e homologia das sequências.

O primeiro grupo é formado pelas proteínas Cry1, Cry3, Cry4, Cry7, Cry8, Cry9 e Cry10, que são muito relacionadas e suas toxinas ativas compartilham cinco blocos de significativa homologia (Höfte e Whiteley, 1989; Lereclus *et al.*, 1993; Baum e Malvar, 1995). Um segundo grupo é formado pelas proteínas Cry5, Cry12, Cry13, Cry14 e Cry 21, que apresentam homologia entre os blocos 1, 2, 4 e 5, sendo encontrada uma variabilidade do bloco conservado 1 em relação aos grupos 1 e 3. As proteínas do segundo grupo apresentam uma variante no bloco 2 e o terceiro bloco completamente ausente (Schnepf *et al.*, 1998). Para ambos os grupos, quando a proteína apresenta a região C-terminal, os blocos 6, 7 e 8 estão invariavelmente presentes (dado não mostrado na figura). O terceiro grupo é formado pelas proteínas Cry2, Cry11 e Cry18, constituído pelo bloco 1 e uma variante truncada do bloco 2 (Lereclus *et al.*, 1989).

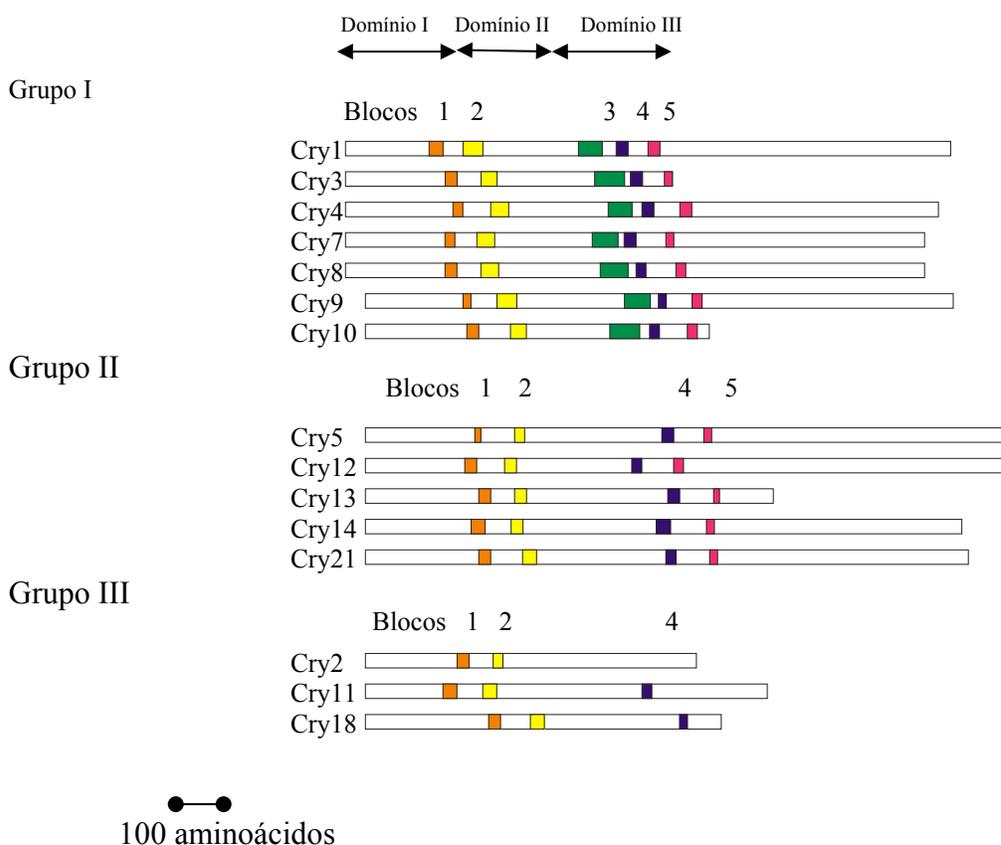


Figura 1.4: Alinhamento da estrutura primária das toxinas Cry. Os retângulos coloridos correspondem às seqüências conservadas. Domínios I, II e III correspondem à toxina ativa. Adaptado de: De Maagd *et al.*, 2001.

2.1.4.1. – Estrutura tridimensional das proteínas Cry

A primeira estrutura molecular de uma proteína cristal (Cry3A) foi determinada através de técnicas de cristalografia de raios-X por Li *et al.* (1991). Esse estudo contribuiu para o conhecimento do modo de ação dessas toxinas. A estrutura tridimensional das formas ativadas das proteínas Cry consiste de três domínios (Fig. 1.5).

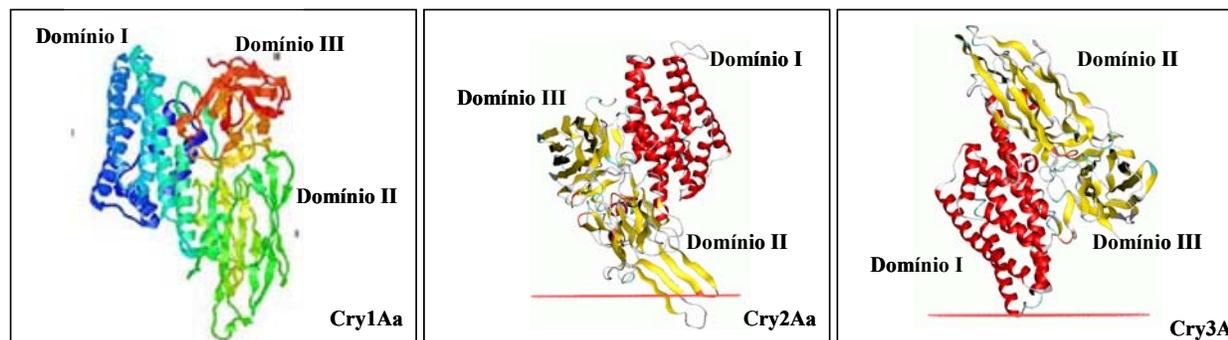


Figura 1.5: Representação esquemática das estruturas das toxinas Cry1Aa, Cry2A e Cry3A (Adaptado de Schnepf *et al.*, 1998). O domínio I compreende sete α -hélices e está relacionado à formação do poro. Domínio II está relacionado com a ligação a receptores de membrana. Este domínio é formado por três folhas β -antiparalelas ao redor de um cerne hidrofóbico, terminando em alças no ápice da molécula. O domínio III corresponde à região C-terminal que consiste de duas folhas β -antiparalelas, formando um β -sanduíche e acredita-se que este domínio esteja fortemente envolvido com a estabilidade estrutural e à ligação ao receptor.

O domínio I, que na proteína Cry3A corresponde aos resíduos 58 ao 290 e na proteína Cry1Aa corresponde aos resíduos 33 ao 253 (N-terminal) consistindo de 7 α -hélices, sendo 6 hélices anfipáticas (α_1 , α_2 , α_3 , α_4 , α_6 e α_7) circundado por uma hélice central, a α -hélice 5, que é hidrofóbica. O domínio II (Cry3A, resíduos 291 ao 500 e Cry1Aa resíduos 265 a 461) é formado por três folhas β -antiparalelas ao redor de um cerne hidrofóbico, terminando em alças no ápice da molécula, formando os loops 1, 2 e 3 (Shimizu e Morikawa, 1996; Rukmini *et al.*, 2000) e o domínio III (Cry3A, resíduos de 501 a 644 e Cry1Aa, resíduos de 463 a 609), que consiste de duas folhas β -antiparalelas formando um β -sanduíche (Fig. 1.5). O domínio I está envolvido na inserção da proteína na membrana e na formação do poro, já os domínios II e III estão envolvidos no reconhecimento e ligação ao receptor. Acredita-se que o domínio III esteja fortemente envolvido com a estabilidade estrutural (de Maagd *et al.*, 2001), protegendo a toxina de

degradação durante o processamento proteolítico e controlando as interações toxina-toxina e pode estar agindo em conjunto com o domínio I, na formação do poro (Rukmini *et al.*, 2000).

2.1.4.2 – Modo de ação das proteínas Cry

A maioria dos estudos sobre o modo de ação das proteínas Cry foi realizada, principalmente, em insetos da ordem Lepidoptera (Knowles e Dow, 1993). Os sintomas observados a partir do momento em que as larvas de insetos suscetíveis ingerem os cristais e esporos de *B. thuringiensis* são: perda do apetite e o abandono do alimento, paralisia do intestino, vômito, diarreia, paralisia total e, finalmente, a morte (Aronson *et al.*, 1986). As larvas infectadas por *B. thuringiensis* perdem sua agilidade e o tegumento adquire tonalidade de cor marrom-escuro. Após a morte, a larva apresenta cor negra, característica das infecções provocadas por este microrganismo (Habib e Andrade, 1998; Monnerat e Bravo, 2000).

O mecanismo de ação das proteínas Cry é um processo que pode ser dividido em várias etapas, como descrito a seguir.

A – Solubilização e processamento das toxinas

Os cristais produzidos por *B. thuringiensis*, ao serem ingeridos por larvas de insetos suscetíveis, são solubilizados no intestino médio, liberando uma ou mais proteínas Cry. O intestino médio da maioria das larvas dos insetos-alvo apresenta um pH em torno de 9,5 (Knowles, 1994). As proteínas específicas para a ordem Lepidoptera são solúveis em pH acima de 9,5 (Knowles e Dow, 1993), o que está de acordo com o pH do intestino das larvas destes insetos, que varia de 9 a 12. Nos insetos da ordem Coleoptera, o pH do intestino é ligeiramente ácido (em torno de 6,0), entretanto a proteína Cry3A, específica para esta ordem, é solúvel em pH abaixo de 3,5 e acima de 9,5. Em função deste fato, outros fatores como detergentes ou a redução do potencial do intestino também devem atuar na solubilização (Bietlot *et al.*, 1990). A Figura 1.6 mostra a representação esquemática das protoxinas Cry e seus sítios de clivagem por proteases.

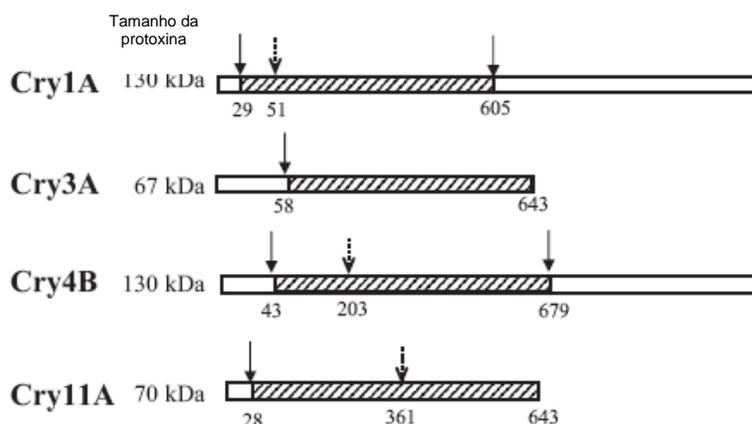


Figura 1.6: Esquema das seqüências de proteínas Cry e seus sítios de clivagem proteolítica (Bravo *et al.*, 2007).

A ativação das protoxinas ocorre posteriormente através da ação de proteases. No caso das proteínas Cry1, o fragmento tóxico de peso molecular de 65 a 55 kDa, é gerado após a remoção de aproximadamente 500 aminoácidos da porção carboxi-terminal e 28 aminoácidos da porção amino-terminal (Knowles, 1994). Já as proteínas Cry2, Cry3 e Cry4, consideradas naturalmente truncadas, não sofrem ação de proteases na porção C-terminal. No caso da proteína Cry3, a remoção desta porção implicaria na perda da atividade inseticida, pois alteraria um dos blocos extremamente conservados (bloco 5) que está envolvido com a toxicidade (Gill *et al.*, 1992). Nesta proteína, a ativação ocorre após a remoção de 50 resíduos na porção N-terminal (Li *et al.*, 1991).

B – Reconhecimento e ligação ao receptor

Foi demonstrado que as proteínas Cry, após serem ativadas por proteases do intestino médio, ligam-se a receptores específicos localizados nas microvilosidades das membranas apicais das células colunares do intestino dos insetos suscetíveis das ordens Lepidoptera (Hoffmann *et al.*, 1988a), Coleoptera (Bravo *et al.*, 1992) e Diptera (Höfte e Whiteley, 1989; Ravoahangimalala *et al.*, 1993).

A união a estes sítios é uma etapa determinante da especificidade das toxinas Cry, o que motivou diversos grupos de pesquisa a se dedicarem ao entendimento desse processo

(Monnerat e Bravo, 2000). A maior parte dos estudos tem sido conduzido com larvas de lepidópteros e toxinas do tipo Cry1 (Pietrantonio e Gill, 1996), mas existem alguns estudos, também, com a toxina Cry3A com larvas do coleóptero *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) (Belfiore *et al.*, 1994) e com as toxinas Cry4Ba e Cry11Aa com larvas de dípteros (*Aedes aegypti*) (Soberón *et al.*, 2007 a/b).

A cinética de união das toxinas Cry às vesículas da membrana da microvilosidade apical dos insetos suscetíveis é bifásica, composta de um passo reversível e outro irreversível (Hoffman *et al.*, 1988a; Van Rie *et al.*, 1989). O primeiro passo envolve a interação entre a toxina e seu sítio de união (união reversível), que é um requisito básico para que ocorra toxicidade, mas não suficiente (Schnepf *et al.*, 1998). No entanto, a união irreversível a receptores específicos e a inserção na membrana parecem estar mais ligadas com a toxicidade (Van Rie *et al.*, 1989; Monnerat e Bravo, 2000).

Em geral, quatro receptores protéicos (Fig. 1.7) têm sido descritos como possíveis moléculas para ligação das proteínas Cry as células do epitélio intestinal dos insetos suscetíveis: uma proteína do tipo caderina (CADR), uma aminopeptidase-N ancorada a glicosilfosfatidil-inositol (GPI), uma fosfatase alcalina ancorada a glicosilfosfatidil-inositol (GPI), e um glicoconjugado de 270 kDa (Gómez *et al.*, 2007; Bravo *et al.*, 2007). Outros experimentos têm mostrado que glicolípídeos também podem estar envolvidos como moléculas receptoras em alguns insetos e nematóides (Gómez *et al.*, 2007).

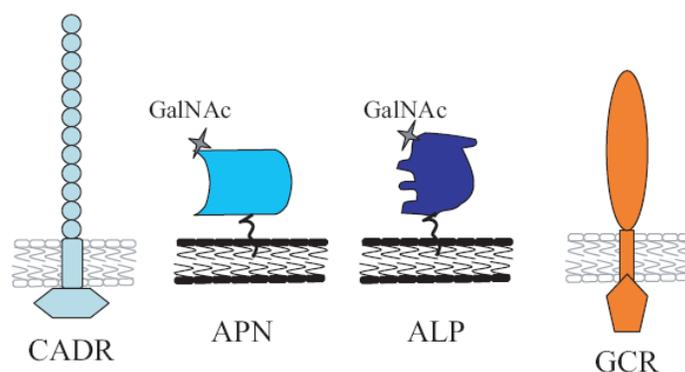


Figura 1.7: Receptores moleculares da proteína Cry1A. CADR, receptor caderina; APN, receptor aminopeptidase-N; ALP, receptor fosfatase alcalina; GCR, receptor glicoconjugado de 270 kDa (Bravo *et al.*, 2007).

As proteínas caderinas representam uma grande família de glicoproteínas responsáveis pelo contato intercelular. São proteínas transmembranas com um domínio citoplasmático e um ectodomínio extracelular com várias repetições de caderinas, no caso do receptor Bt-R₁, as repetições de caderinas, são em número de 12 (Vadlamudi *et al.*, 1995). Chen *et al.* (2005) demonstraram em seus trabalhos que a CADR de *Manduca sexta* está localizada nas microvilosidades das células do intestino médio da lagarta.

As aminopeptidases N (APN) são exopeptidases ligadas a membranas celulares através de uma ancora de GPI. As APN de vários grupos de insetos lepidópteros foram classificadas dentro de quatro grupos: APN1, APN2, APN3 e APN4. Vários estudos têm demonstrado que APN1 está relacionada com a ligação da proteína Cry1Ac (Gill e Ellar, 2002; Herrero *et al.*, 2005; Oltean *et al.*, 1999; Rajagopal *et al.*, 2002 citados por Gómez *et al.*, 2007).

As APN e as ALP são ambas proteínas ancoradas a GPI e estão incluídas dentro de plataformas de lipídeos (“lipid rafts”) que estão ordenadas em espaços diferenciados dentro de microdomínios das membranas celulares. Essas plataformas de lipídeos são enriquecidas com glicoesfingolipídeos, colesterol e com proteínas ancoradas a GPI e, possivelmente, estão envolvidas em vias de transdução de sinal. Segundo Gómez *et al.* (2007), a interação de toxinas que formam poros, com as proteínas Cry incluídas em plataformas de lipídeos na membrana pode resultar em eventos celulares adicionais, incluindo internalização da toxina, transdução de sinal e resposta celular. Até o momento já foram identificados vários receptores para diferentes insetos (Tab. 1.1).

Tabela 1.1 – Receptores para proteínas Cry.

Toxina	Inseto	Tamanho do receptor (kDa)	Identidade	Referência
Cry1Aa	<i>Bombix mori</i>	120	aminopeptidase N	Yaoi <i>et al.</i> , 1997
Cry1Ab	<i>Manduca sexta</i>	210	caderina	Vadlamudi <i>et al.</i> , 1995
Cry1Ab	<i>Manduca sexta</i>	120	aminopeptidase N	Denolf <i>et al.</i> , 1997
Cry1Ab	<i>Plutella xylostella</i>	120	aminopeptidase N	Denolf <i>et al.</i> , 1997
Cry1Ac	<i>Manduca sexta</i>	120	aminopeptidase N	Knight <i>et al.</i> , 1994; Sangadala <i>et al.</i> , 1994
Cry1Ac	<i>Heliothis virescens</i>	120	aminopeptidase N	Gill <i>et al.</i> , 1995
Cry1Ac	<i>Lymantria dispar</i>	120	aminopeptidase N	Valaitis <i>et al.</i> , 1995
Cry1Ac	<i>Plutella xylostella</i>	120	aminopeptidase N	Luo <i>et al.</i> , 1997
Cry1C	<i>Manduca sexta</i>	120	aminopeptidase N	Luo <i>et al.</i> , 1996
Cry4Ba	<i>Aedes aegypti</i>	65	GPI-fosfatase alcalina	Fernández <i>et al.</i> , 2006
Cry11Aa	<i>Aedes aegypti</i>	65	GPI-fosfatase alcalina	Fernández <i>et al.</i> , 2006
Cry11Ba	<i>Anopheles quadrimaculatus</i>	120	aminopeptidase N	Abdullah <i>et al.</i> , 2006

C – Inserção na membrana, agregação e formação do poro

Após ligação a receptores específicos, a toxina Cry se une rápida e irreversivelmente à membrana plasmática das células epiteliais, com subsequente abertura ou formação de poros, ocorrendo, assim, um desequilíbrio osmótico entre o meio intra e extracelular, ocasionando perda da integridade da membrana do intestino das larvas de insetos suscetíveis (Van Rie *et al.*, 1989; Ihara *et al.*, 1993; Liang *et al.*, 1995; Rabinovitch *et al.*, 2000).

De uma maneira geral, há um consenso sobre os passos iniciais da ligação dos monômeros de toxinas Cry aos receptores intestinais dos insetos. Porém, alguns autores discordam entre si do mecanismo molecular de ação destas toxinas. Pigott e Ellar (2007) descreveram em sua revisão os três modos de ação, que são propostos e discutidos atualmente para toxina Cry1A. Os dois primeiros modos diferem consideravelmente em termos de como os receptores são importantes para a atividade tóxica da proteína e como eles funcionam, facilitando a ação da mesma. O terceiro combina elementos dos dois primeiros modos de ação e propõe uma função para uma classe adicional de receptores.

Bravo *et al.* (2007), propuseram um modelo da interação da toxina Cry1Ab para *Manduca sexta*, que é uma versão atualizada do modelo proposto por Knowles e Ellar (1987) e propõe que ambos receptores, caderina e APN são necessários para toxicidade da proteína Cry1A para *M. sexta* (Fig 1.8). O primeiro passo é a ligação desta toxina ao

receptor Bt-R₁ (caderina), o qual, promove uma clivagem proteolítica adicional da toxina, no domínio I, na porção da α -hélice 1, facilitando a formação da estrutura oligomérica, denominada de pré-poro, que é importante para a inserção da proteína na membrana celular (Gómez *et al.*, 2002; Russeal *et al.*, 2004 citado por Bravo *et al.*, 2007). Esta forma oligomerizada da toxina forma um pré-poro, possivelmente tetramérico, que se liga preferencialmente a um segundo receptor do tipo APN, com alta da afinidade de ligação. A APN, então, direciona a estrutura pré-poro para a plataforma de lipídeos, que facilita a inserção e a formação do poro lítico na membrana celular. Knowles e Dow (1993) descreveram que a formação de menos de 200 poros, com um raio de 0,5 a 1,0 nm, na membrana apical de células colunares, leva a uma rápida mudança no potencial de membrana, no equilíbrio de íons através da membrana, no influxo de água, intumescimento da célula, e eventual lise.

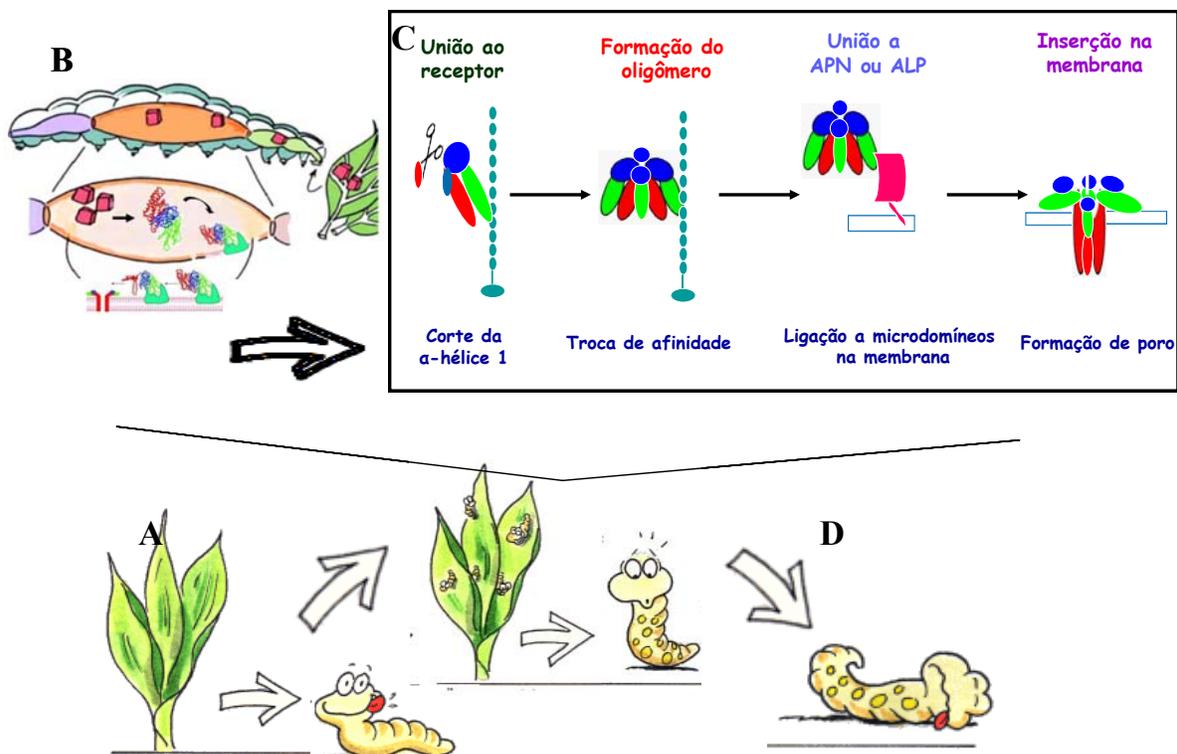


Figura 1.8: Esquema do modo de ação de toxinas Cry1A para lepidópteros proposto por Bravo *et al.*, 2007. A – O inseto ingere a proteína cristal; B – no intestino médio da larva os cristais são solubilizados e ativados em proteínas monoméricas que se ligam ao primeiro receptor (caderina ou receptor glico-conjugado de 270 kDa). C – a toxina sofre mudanças conformacionais e a α -hélice 1 é clivada levando a formação do oligômero que liga-se com alta afinidade ao segundo receptor (APN-GPI ou ALP-GPI), inserção na plataforma de lipídeos da membrana e formação do poro; D – levando o inseto à morte (Adaptado de Bravo *et al.*, 2007).

Zhang *et al.* (2005), contestou a teoria de que Cry1Ab mata células exclusivamente por lise osmótica e argumentou que a correlação entre a formação dos poros e a citotoxicidade não foi adequadamente demonstrada e propôs um modo de ação alternativo, em que formas monoméricas da proteína Cry1Ab se ligariam ao receptor BT-R₁ e iniciariam uma cascata de sinalização dependente de Mg²⁺ que promoveria a morte celular (Fig 1.9). Outros trabalhos sugerem que a ligação ao receptor ativaria a via de sinalização envolvendo a ativação de uma proteína G, uma adenilato ciclase, e com o conseqüente aumento dos níveis de AMP cíclico (AMPC), e ativação da proteína quinase A (PKA), levando à desestabilização do citoesqueleto e dos canais de iônicos e posterior morte celular (Zhang *et al.*, 2006). Em sua revisão, Piggott e Ellar (2007), fazem uma ressalva sobre o modo de ação proposto por Zhang, uma vez que outros trabalhos (Knowles e Farndale, 1988), haviam mostrado anteriormente que toxinas Cry aumentavam os níveis de AMPC em células de *Mamestra brassicae*, e que os efeitos sobre a adenilato ciclase, eram mais efeitos secundários, da interação da toxina com a membrana, do que do efeito citolítico em si. Piggott e Ellar (2007), sugerem que mais trabalhos deveriam ser realizados para reforçar o modelo proposto por Zhang e confirmar a ligação entre a citotoxicidade das toxinas Cry e o aumento de AMPC celular, principalmente, mostrando como a proteína quinase A age *in vivo*, uma vez que todos os trabalhos foram realizados *in vitro*.

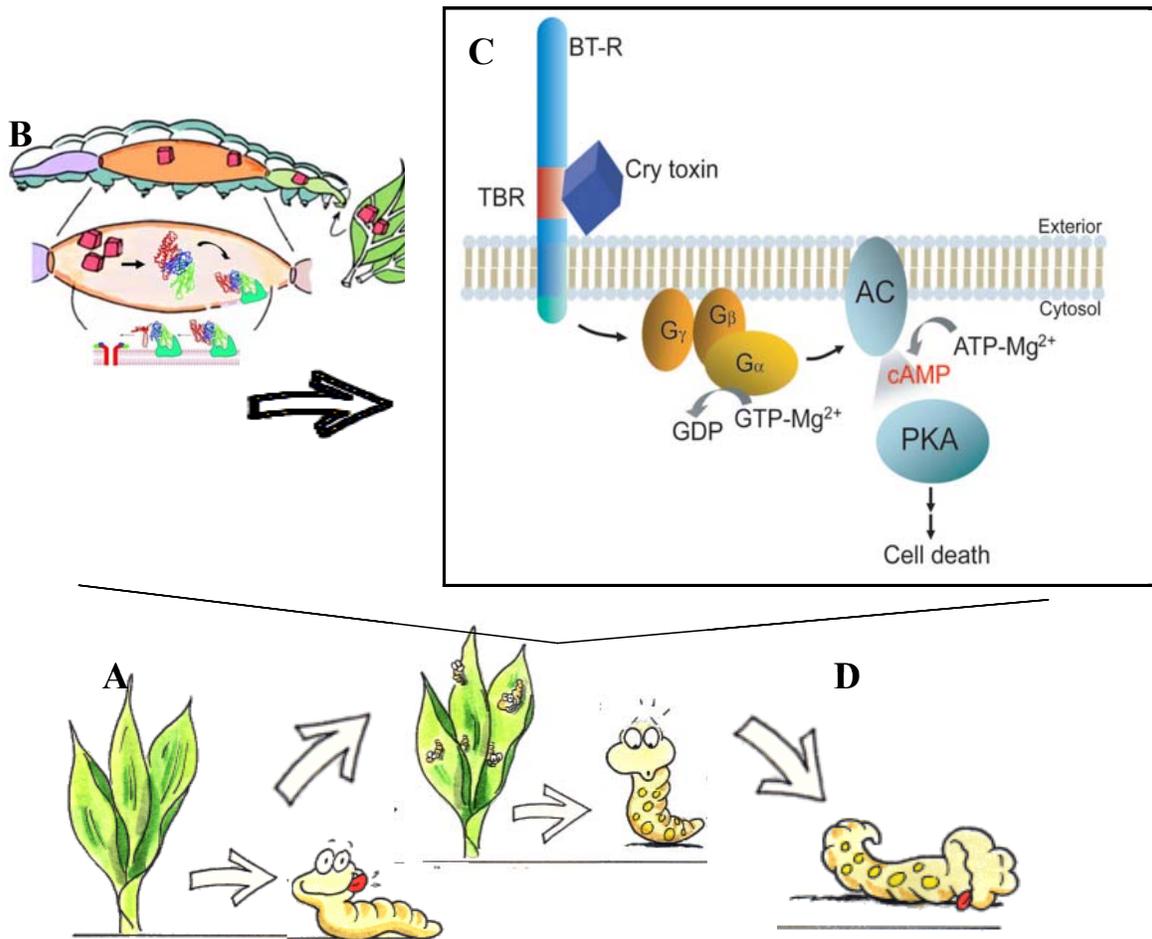


Figura 1.9: Esquema do modo de ação de toxinas Cry1A, proposto por Zhang *et al*, 2005. A – O inseto ingere a proteína cristal; B – no intestino médio da larva os cristais são solubilizados e ativados. C – a toxina Cry se liga ao receptor BT-R estimulando proteína G e adenilato ciclase, que ativa a produção intracelular de AMPc. Desta forma, a ativação da proteína quinase A desestabiliza o citoesqueleto e os canais iônicos; D – levando o inseto à morte (Adaptado de Zhang *et al*, 2006 e Zhang *et al*, 2005).

O último modelo proposto para explicar o modo de ação da proteína Cry1Ac em *Heliothis virescens* foi proposto por Jurat-Fuentes e Adang em 2006 (Fig 1.10). O modelo sugere que a citotoxicidade é devida aos efeitos combinados de lise osmótica e da sinalização celular e, portanto, elementos de ambos os modelos de modo de ação, anteriormente propostos, por Bravo e por Zhang. Primeiramente, formas monoméricas da proteína Cry1Ac se ligariam a uma proteína do tipo caderina (HevCaLP). Esta ligação resultaria na ativação de uma via de sinalização intracelular regulada por fosfatases. As evidências que levaram a esta conclusão foram obtidas a partir de uma análise proteômica de BBMV's de estirpes de *H. virescens* resistentes e suscetíveis a toxina Cry1Ac que mostraram diferentes níveis de fosfatases intracelulares. Os trabalhos de McNall e Adang (2003) e Jurat-Fuentes e Adang (2006) mostram que a sinalização poderia ser dependente da interação direta entre a proteína Cry1Ac e actina. Zhang *et al.* (2005) mostraram que vias apoptóticas intracelulares são ativadas após a ligação da toxina Cry1A com proteínas caderina, e que este passo estaria envolvido na toxicidade da mesma. Actina interage com tirosina fosfatase, catenina e actina com o domínio citosólico das proteínas caderinas, ativando vias intracelulares em resposta a sinais extracelulares. Após a ligação das formas monoméricas da proteína Cry1Ac a HevCaLP, Cry1Ac sofre um processo de oligomerização e, então, se liga a APN-GPI (como no modelo descrito por Bravo) ou a ALP-GPI. Após esta ligação, o oligômero é dirigido à plataforma de lipídeos, onde há a formação do poro, resultando em choque osmótico e na ativação das vias de sinalização que levam à morte celular (Jurat Fuentes e Adang, 2006).

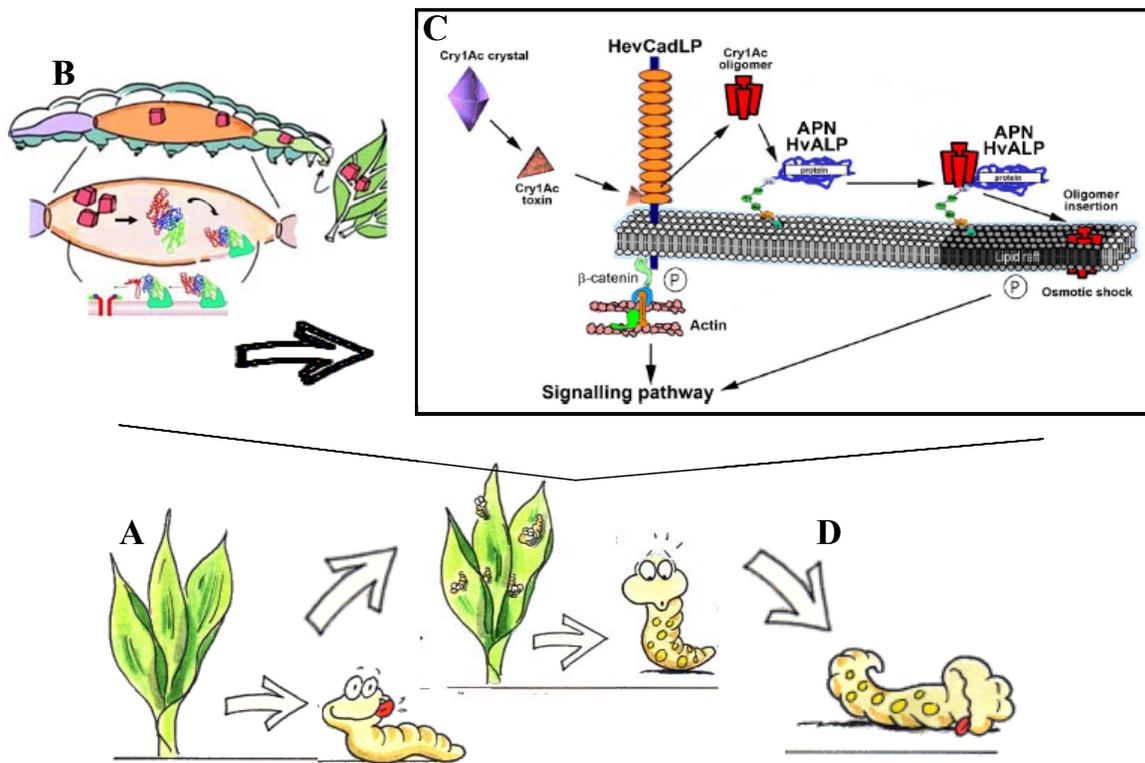


Figura 1.10: Esquema do modo de Ação de toxinas Cry1A, proposto por Jurat Fuentes e Adang, 2006. A – O inseto ingere a proteína cristal; B – no intestino médio da larva os cristais são solubilizados e ativados em proteínas monoméricas que se ligam ao receptor Caderina. C – Esta ligação resulta na ativação de vias de sinalização intracelulares reguladas por fosfatases (P). Após ligação ao receptor Caderina, monômeros da toxina são processados e formam oligômeros que se ligam a proteínas ancoradas a GPI (ALP ou APN) que estão em plataformas de lipídeos. A presença desta toxina em plataformas de lipídeos possui efeito duplo, induzindo a inserção da toxina na membrana, formando poros e ativando vias de sinalização intracelular que podem ativar respostas apoptóticas e choque osmótico induzidos pela formação do poro, contribuindo para a morte celular; D – levando o inseto à morte (Adaptado de Jurat-Fuentes e Adang, 2006).

2.2 – Regulação da expressão dos genes *cry*

As diversas proteínas Cry são sintetizadas durante a fase estacionária e acumuladas exclusivamente no compartimento da célula-mãe (Ribier e Lecadet, 1973). Embora os genes *cry* estejam presentes em baixos números de cópias, a síntese das δ -endotoxinas é de tal maneira eficiente que pode representar cerca de 25-30% das proteínas totais da bactéria em esporulação. Esse conjunto de observações indica a existência de um controle temporal e espacial na expressão desses genes, que ocorre de maneira extremamente eficiente.

2.2.1 – Controle temporal e espacial na expressão dos genes *cry*.

De acordo com o início da expressão, com relação à fase do crescimento, esses genes podem ser agrupados em: dependentes e não dependentes da esporulação.

A – Genes dependentes da esporulação

Em bactérias esporulantes, este processo pode ser dividido em sete estágios sequenciais, morfologicamente bem definidos e distinguíveis por características bioquímicas peculiares (Betchtel e Bulia, 1976; Losick *et al.*, 1986). Esta série de eventos vai dar origem ao esporângio, que consiste em dois compartimentos celulares designados célula-mãe e pré-esporo. Em *B. subtilis*, esse processo de diferenciação celular é regulado de maneira temporal e a nível transcricional, graças à ativação de seis fatores sigma (σ). σ^A , o principal fator ativo durante a fase vegetativa; e cinco fatores que atuam na fase de esporulação e são designados σ^H , σ^F , σ^E , σ^G e σ^K , em ordem de ativação durante o processo (Haldewang, 1995). Os fatores σ^A e σ^H atuam antes da formação do septo que dá origem a compartimentalização, σ^F e σ^E são ativos na célula-mãe e, σ^G e σ^K são ativos no compartimento do pré-esporo. Estes fatores transcricionais se ligam ao núcleo da RNA polimerase conferindo especificidade por promotores de genes determinados (Ribier e Lecadet, 1973).

Os produtos dos genes de δ -endotoxinas dependentes da esporulação começam a ser sintetizados a partir de t_2 (t_n é o número de horas após o início da fase de esporulação, que é designado t_0 ; em *B. thuringiensis* t_2 coincide com o estágio II) e são acumulados na célula-mãe, havendo um incremento no tamanho do cristal até o t_{12} (Ribier e Lecadet, 1973).

Os dois pontos de início da transcrição do gene *cryIAa* de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, mapeados por Wong *et al.* (1983), definiram dois promotores com sequências sobrepostas e que são ativados de maneira seqüencial. No BTI, o primeiro desses promotores, é utilizado a partir do estágio II da esporulação e é reconhecido pela RNA polimerase, associada ao σ^{35} (Brown e Whiteley, 1988). BTII é reconhecido pelo complexo $E\sigma^{28}$, a partir do estágio III (Brown e Whiteley, 1990). Os genes que codificam estes dois fatores sigma foram clonados e seqüenciados (Adams *et al.*, 1991). As sequências de aminoácidos deduzidas dos fatores σ^{35} e do σ^{28} apresentam homologia de 88% e 85% com os fatores σ^E e σ^K de *B. subtilis*, respectivamente. Este alto grau de homologia e habilidade em conduzir a transcrição a partir de promotores de *B. subtilis*, especificamente reconhecidos por σ^E e σ^K (Adams *et al.*, 1991), indicam uma homologia funcional entre os respectivos pares de fatores sigma. Regiões similares contendo os dois tipos de promotores são encontradas à montante de todos os demais genes *cryI* e genes das classes *cry2*, *cry4*, e *cyt*. Assim, a regulação temporal da síntese da proteína cristal é, pelo menos em parte, assegurada por sucessivas trocas de fatores sigma.

O alto nível de expressão em perfeita coordenação com a esporulação faz do *B. thuringiensis* um modelo notável para a investigação da regulação gênica em bactérias Gram positivas, capazes de esporular.

B – Genes não dependentes da esporulação

O gene *cry3A* encontrado em *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* possui atividade para a ordem Coleoptera (Sekar *et al.*, 1987) e em contraste com os demais genes *cry* descritos, sua expressão não está associada à esporulação. O promotor deste gene é fracamente ativo durante a fase vegetativa (De-Souza *et al.*, 1993), e a expressão é iniciada no final da fase exponencial, permanecendo apenas até cerca de t_8 . A sequência promotora responsável pela transcrição deste gene não apresenta homologia com as sequências dos promotores Bt I e Bt II, mas é similar à sequência canônica reconhecida pelo σ^A (De-Souza *et al.*, 1996; Agaisse e Lereclus, 1994a). Ademais, a ativação da sequência promotora do referido gene não é dependente dos fatores sigma específicos da esporulação, nem em *B. subtilis* (Agaisse e Lereclus, 1994b), nem em *B. thuringiensis* (Agaisse e Lereclus, 1995). Em adição, a expressão do gene *cry3A* é aumentada e prolongada em estirpes mutantes que

são incapazes de esporular (Agaisse e Lereclus, 1995; Lereclus *et al.*, 1995; Agaisse e Lereclus, 1994b). Isso sugere que fatores de transcrição envolvidos na transição da fase exponencial para a fase estacionária são os responsáveis pela regulação da expressão desses genes. Igualmente, a análise da cinética de produção de β -galactosidase, através de fusões transcricionais (*cry3A/lacZ*), sugere que tanto em *B. subtilis* (Agaisse e Lereclus 1994b) quanto em *B. thuringiensis*, (Agaisse e Lereclus, 1995) existe um evento que reprime a expressão desse gene durante fases mais avançadas da esporulação após t_8 . No entanto, o elemento envolvido neste evento ainda não foi identificado.

C – Estabilidade dos mRNAs

A estabilidade dos RNA mensageiros (mRNA) é um elemento importante na maximização da expressão gênica. Em 1972, Glatron e Rapoport relataram que os transcritos específicos dos genes *cry* têm uma meia-vida bastante elevada e estimada em torno de dez minutos. A presença dos elementos Cis envolvidos na degradação de mRNA, comumente descritos para *Escherichia coli* e *B. subtilis*, nas regiões 5' e 3' não traduzidas dos mensageiros dos genes *cry*, pode explicar, em grande parte, a alta estabilidade dessas moléculas (Agaisse e Lereclus, 1995).

Wong e Chang (1986) descreveram a presença de sequencias repetidas com orientação invertida (*inverted repeated*, IR), localizadas na extremidade 3' do mensageiro do gene *cryIA*. O potencial desta IR em formar estrutura em alça proporcionaria proteção aos mensageiros contra degradação por exorribonucleases com atividade 3' - 5'. É importante observar que este tipo de estrutura terminadora putativa, denominada retroregulador positivo, é freqüentemente encontrada à jusante das sequencias codificadoras dos genes *cry*.

A identificação e a análise funcional de uma longa sequencia de DNA (fragmento H²-H³), que se estende até cerca de 600 pb do início da tradução do gene *cry3A*, sugerem que esta sequencia está envolvida na estabilidade do mensageiro (Agaisse e Lereclus 1994a, De-Souza *et al.*, 1993). Fusões transcricionais com o gene repórter *lac-Z* revelaram que duas regiões distintas estão envolvidas na expressão do gene. Um fragmento de DNA, localizado entre os nucleotídeos (nt) - 635 e -558 (com referência ao ponto do início da tradução), está envolvido na transcrição e contém o promotor *stricto sensu*. A segunda

região, que se estende entre os nt -129 e -12, exerce um efeito ao nível pós-transcricional, sendo um ponto de clivagem que permite o acúmulo de mensageiros estáveis com extremidade 5' mapeada no nt -129. O provável elemento estabilizador é uma sequência homóloga à sequência Shine-Dalgarno (SD) consenso e que está presente na extremidade 5' do mRNA de *cry3A*. A sequência SD não está envolvida no início da tradução, porém análises de mutações introduzidas nesta região sugeriram, fortemente, que o fenômeno se deve a interações de sequência SD com a extremidade 3' do rRNA 16S. O complexo formado com a ligação da subunidade 30S do rRNA e a extremidade 5', não traduzida do gene *cry3A*, poderia conferir estabilidade ao mensageiro. É importante ressaltar que a sequência SD está presente em posição similar a outros dois membros da classe *cry3*, *cry3B* e *cry3B2* (Donovan *et al.*, 1992). Portanto, mecanismos semelhantes podem estar envolvidos na estabilização de mensageiros de outros membros da classe *cry3*.

D – Número de cópias dos genes *cry* e diferenciação na expressão

O número de cópias de cada gene *cry* presente em uma determinada estirpe é, provavelmente, um outro fator fundamental na produção relativa de cada tipo de δ -endotoxina e, conseqüentemente, no espectro de atividade entomocida (Agaïsse e Lereclus, 1995; Lereclus *et al.*, 1993). Estes devem ser considerados individualmente quando se quer entender a toxicidade geral de uma estirpe. Efeitos de titulação, tais como competição por fatores de transcrição, poderiam causar condições desfavoráveis aqueles genes portadores de sequências promotoras homólogas e presentes em uma mesma estirpe, porém com número de cópias mais baixo que os outros, explica, pelo menos em parte, a diferenciação na expressão.

3 – Sistemas de Expressão de Proteínas Cry

Diferentes sistemas de expressão são hoje utilizados na tentativa de isolar proteínas Cry recombinantes a fim de se estudar isoladamente a atividade de cada uma.

3.1 – Expressão heteróloga em *Escherichia coli*

Os sistemas de expressão variam de acordo com as vantagens e desvantagens associadas à sua estratégia e célula de escolha. Os sistemas procarióticos apresentam como principal vantagem, a relativa facilidade de manutenção de culturas bacterianas além da grande quantidade de proteína recombinante que pode ser produzida em pouco tempo. A bactéria *Escherichia coli* é bastante utilizada como sistema de expressão (Barros, 2007). Em 1981, o primeiro gene *cry* foi clonado e expresso em *E. coli* (Schnepf e Whitley, 1981), desde então, várias outras proteínas Cry vêm sendo expressas neste sistema, Cry1Ab (Shibano *et al.*, 1985), Cry1Ac (Adang *et al.*, 1985), Cry2A (Donovan *et al.*, 1988), Cry10Aa (Thorne *et al.*, 1986), Cry11Aa (Donovan *et al.*, 1988), entre outros.

3.2 – Expressão homóloga em *Bacillus thuringiensis*

Assim, como a expressão em *E. coli*, a expressão em Bt apresenta diversas vantagens, como a expressão homóloga de proteínas Cry, a facilidade de cultivo em larga escala e a capacidade de formação de cristais, facilitando os processos de purificação da proteína expressa. Diversas proteínas Cry já foram expressas neste sistema entre elas Cry10Aa (Thorne *et al.*, 1986), Cry2Ab (Dankocsik *et al.*, 1990), Cry3Aa (Park *et al.*, 1998), Cry2A e Cry11A (Ge *et al.*, 1998), Cry1Ba (Zhong *et al.*, 2000), Cry32 (Kim *et al.*, 2003), Cry48 e Cry49 (Jones *et al.*, 2007), entre outros.

4 – Proteínas Cry com atividade para *Anthonomus grandis* e *Spodoptera frugiperda*

Como mencionado anteriormente, o bicudo do algodoeiro, é um inseto de difícil controle, e nos últimos anos alguns genes *cry* tem sido identificados como possíveis meios para controle deste inseto.

4.1 – CryII

Taylor *et al.* (1992), foram os primeiros a descrever uma nova classe de genes *cry* codificadores de proteínas denominadas CryII (também referida como CryV na nomenclatura anterior), que codifica uma protoxina de 81 kDa a qual, quando ativada

proteoliticamente, é clivada em uma toxina de aproximadamente 65 kDa (Gleave *et al.* 1993), com atividade inseticida dupla para *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera) e para *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera) (Tailor *et al.*, 1992; Tounsi e Jaoua, 2002).

Shin *et al.* (1995), reportaram que genes da classe *cryII* são silenciados em estirpes de *B. thuringiensis*, devido ao fato destes genes serem localizados a jusante ("downstream") de outros genes da classe *cryI*, sendo que a sequência terminadora dos genes *cryI* se localiza no intervalo entre os genes *cryI* e *cryII*. Masson *et al.* (1998), reportaram que Bt sub. *aizawai* estirpe HD-133 expressa um gene *cryIIa* durante o estágio inicial ("early stage") da esporulação, na fase estacionária.

Em um trabalho realizado pelo nosso grupo (Martins *et al.*, 2008), conseguimos mostrar a expressão e cristalização desta proteína em células de insetos, através de um sistema de expressão baculovírus. A proteína recombinante CryIIa foi testada contra larvas neonatas de *A. grandis* e de segundo instar de *S. frugiperda*, mostrando uma atividade inseticida significativa. Para *A. grandis* foi obtida uma CL_{50} de $21,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ($G= 0,034$ e $p < 0,01$) e para *S. frugiperda* uma CL_{50} p de $0,289 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ($G= 0,182$ e $p < 0,01$).

4.2 – Cry10

O gene *cry10Aa* é encontrado comumente em estirpes de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* que possui várias proteínas com atividade tóxica para diversos insetos da ordem Diptera, entre elas estão a Cry4Aa, Cry4Ba, Cry10Aa, Cry11Aa, Cyt1Aa e Cyt2Ba (Ben-Dov *et al.*, 1999; Guerchicoff *et al.*, 1997; Berry *et al.*, 2002 citados por Aguiar, 2007). Este gene, codifica uma protoxina de 78 kDa que é clivada em uma toxina ativa de 60 kDa e sua atividade foi primeiramente descrita para insetos da ordem Diptera (Thorne *et al.*, 1986). A proteína Cry10 já teve sua atividade relatada para insetos lepidópteros (Vassal *et al.*, 1993) e há poucos anos, teve pela primeira vez relatada a atividade contra *Hipotenemus hampei*, um inseto da ordem Coleoptera (Méndez-López *et al.*, 2003).

Recentemente, a proteína recombinante Cry10Aa produzida pelo baculovírus recombinante vSynCry10Aa foi descrita com atividade para larvas neonatas de *A. grandis* (Aguiar, 2007), com uma CL_{50} de $7,12 \mu\text{g.mL}^{-1}$ estatisticamente distinta da obtida por Martins *et al.* (2008) para a proteína CryIIa.

A descoberta da alta suscetibilidade de *A. grandis* para a proteína Cry10Aa pode resultar em uma nova alternativa no controle dessa praga. A toxicidade apresentada pela proteína Cry10Aa a insetos da ordem Coleoptera possibilitará o estudo de suscetibilidade de outros insetos dessa ordem a essa proteína. Outro fator importante para estudo da toxicidade apresentada pela proteína Cry10Aa para insetos da ordem Coleoptera é a possibilidade de se estudar o sinergismo que esta proteína pode apresentar com outras proteínas Cry com atividade conhecida para insetos dessa ordem.

4.3 – Cry1B

O gene *cry1B* foi clonado e sequenciado pela primeira vez em 1988 por Brizzard e Whiteley, porém ainda sem descrição da atividade. Os estudos de Hofte e Witley (1989) revelaram que esta era uma proteína de 140 kDa e possuía alta homologia com a porção C-terminal de proteínas da família Cry1 e que a sua porção N-terminal (tóxica) se alinhava com a mesma porção de proteínas da família Cry3 (Bradley *et al.*, 1995). Estes estudos comparativos sugeriam que esta proteína teria atividade para insetos das ordens Lepidoptera e Coleoptera. Bradley *et al.* (1995), mostraram em seus trabalhos que esta proteína possui atividade contra os lepidópteros *Phthorimaea operculella*, *Artogeia rapae*, *Plutella xylostella* e *Tricloplusia ni* (alta atividade) e para os coleópteros *Leptinotarsa decemlineata* (baixa atividade) e *Chrysomela scripta* (média atividade) em ensaios seletivos. Neste mesmo trabalho, os autores, demonstraram que a proteína Cry1B possui uma DL₅₀ de 1,49 µg para *C. scripta*. Zhong *et al.* (2000), demonstraram a atividade da proteína Cry1Ba1 para *Musca domestica* (CL₅₀ 20 µg.mL⁻¹), *C. scripta* (CL₅₀ 150 µg.mL⁻¹) e *M. sexta* (CL₅₀ 190 µg.mL⁻¹). Em 2006, Nathan *et al.* mostraram que a proteína Cry1Ba4 possui atividade contra *P. xylostella*, indicando que esta proteína possui atividade para lepidópteros, podendo ser um candidato para o controle de larvas de *S. frugiperda*. Recentemente, o nosso grupo de pesquisa (Martins *et al.*, 2007) mostrou que estirpes de Bt ativas contra *A. grandis* possuem em sua constituição gênica o gene *cry1B*, indicando que esta proteína possa estar envolvida na atividade contra *A. grandis*.

OBJETIVOS

Objetivo Geral:

Estudar o modo de ação de algumas toxinas Cry de *B. thuringiensis* ativas contra insetos-praga do algodoeiro

Objetivos Específicos:

- Selecionar estirpes de *B. thuringiensis* com atividade para *A. grandis*
- Analisar o conteúdo de genes *cry* das estirpes selecionadas;
- Analisar o perfil protéico dos cristais produzidos pelas estirpes selecionadas;
- Avaliar a morfologia dos cristais produzidos pelas estirpes selecionadas;
- Clonar e expressar os genes que possam ser considerados responsáveis pela produção de toxinas ativas contra *A. grandis*;
- Avaliar a atividade destas toxinas recombinantes expressas isoladamente para *A. grandis*;
- Avaliar a interação destas toxinas com BBMV's de *A. grandis* e *S. frugiperda*;
- Identificar o provável receptor para tais proteínas.

CAPÍTULO II

“A persistência é o caminho do êxito”. (Charles Chaplin)

CARACTERIZAÇÃO DE ESTIRPES DE *Bacillus thuringiensis* TÓXICAS AO BICUDO DO ALGODOEIRO (*Anthonomus grandis* Boheman)

1. Introdução

A cultura do algodão está classificada entre as principais culturas agrícolas do Brasil, assumindo grande importância econômica, social e política, tanto em áreas rurais quanto nos setores industriais.

Na maioria dos países onde o algodoeiro é cultivado comercialmente, a vulnerabilidade às pragas representa o principal problema dessa cultura. Sem alternativas de controle mais eficazes, o agricultor permanece utilizando produtos químicos para o controle de pragas. Em todo o mundo, procuram-se formas alternativas para o combate de pragas, que sejam menos prejudiciais ao ser humano e ao ambiente e que, sejam capazes de reduzir o tamanho das populações de insetos-praga para níveis que não causem danos econômicos às lavouras (Monnerat *et al.*, 2001).

Uma alternativa para o controle de pragas é a utilização de agentes microbianos com atividade entomopatogênica. Entre estes, destaca-se o *Bacillus thuringiensis* (Bt), que é uma bactéria aeróbia, Gram positiva, da família Bacillaceae caracterizada pela produção, no momento de sua esporulação, de inclusões protéicas cristalinas, que são eficazes contra vários grupos de insetos (Feiltelson *et al.*, 1992). Estas proteínas são produzidas sob forma de protoxinas, sendo transformadas em toxinas no intestino do inseto pela ação do pH alcalino intestinal e de proteases. A proteína ativada causa lise das células epiteliais e a morte das larvas (Aronson *et al.*, 1986).

Uma das vantagens da utilização de *B. thuringiensis* é a especificidade aos insetos sensíveis à ação de suas toxinas, o efeito não poluente ao meio ambiente, a inocuidade aos mamíferos e invertebrados e ausência de toxicidade às plantas (Whiteley e Schnepf, 1986; OMS, 1987). Experimentos *in vivo* nos quais administram-se altas doses de proteínas Cry a

outros organismos, que não insetos, tem demonstrado não causarem nenhuma alteração na atividade metabólica dos mesmos comprovando sua inocuidade aos demais organismos (Shimada *et al.*, 2003).

Um dos insetos de possível controle pela ação do *B. thuringiensis*, é o bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis* Boheman). Este coleóptero é uma praga de difícil controle, pois sua fase larval é endofítica, não sendo, portanto, passível de ser controlada por biopesticidas ou por métodos convencionais. Na fase adulta, este inseto se alimenta dos botões florais e maçãs do algodoeiro, onde faz a oviposição. A principal forma de controle deste inseto tem sido feita pela utilização de produtos químicos (França, 1993), cuja aplicação exige um grande investimento onerando ou mesmo, em alguns casos, inviabilizando a produção (Castro, 1992).

Para insetos da ordem Coleoptera, as toxinas comumente descritas são as das classes Cry3 e Cry8, porém, algumas toxinas das classes Cry1, Cry4, Cry22, Cry12, Cry18 e Cry34 têm sido descritas como ativas para esta ordem.

A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen) possui um banco de isolados de *Bacillus spp.* entomopatogênicos (Monnerat *et al.*, 2001), onde estão armazenadas diferentes estirpes de *B. thuringiensis*. O objetivo deste trabalho foi identificar e caracterizar estirpes de *B. thuringiensis*, que apresentem atividade patogênica para o bicudo do algodoeiro, que poderão ser utilizadas como fonte de genes para a construção de uma planta transgênica.

2. Materiais e Métodos

2.1 – Estirpes:

Foram utilizadas 215 estirpes de *B. thuringiensis* pertencentes ao banco de *Bacillus spp.* entomopatogênicos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Essas estirpes são originárias de amostras de solo e água de diferentes regiões do país (Monnerat *et al.*, 2001).

2.2 – Insetos:

Os insetos utilizados para o bioensaio foram obtidos do laboratório de criação de insetos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, onde é feita a criação massal de bicudo do algodoeiro. Os insetos foram mantidos em ambiente controlado sob as seguintes condições: temperatura de 25 °C, umidade relativa de 60% e fotoperíodo de 14:10. Grupos de 500 adultos foram mantidos em recipiente plástico com uma base em forma de malha com abertura de aproximadamente 1,0 mm, posicionada sobre um recipiente coletor, no qual os ovos e as fezes podem cair e serem acumulados (Fig. 2.1).

Os adultos foram alimentados em dieta artificial composta de 43,5 g de ágar (Biobras) 60 g de levedo de cerveja, 60 g de germen de trigo, 40 g pharmamedia (Traders Protein, Memphis, Tennessee, E.U.A.), 100 g de proteína de soja, 60 g de sacarose, 10g de sais minerais (21% CaCO_4 , 0,039% Cu_2SO_4 , 9% MgSO_4 , 0,009% K_2SO_4 , 12% KCl , 31% KH_2PO_4 , 0,057% NaF , 14,9% $(\text{Ca}_3\text{PO}_4)_2$, 1,47% FePO_4 , 0,02% MnSO_4 , 0,009% $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, 0,005 KI , 10,5% NaCl), 20 g de ácido ascórbico, 2,4 g de ácido sórbico, 2 g de nipagim (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) e 10 mL de solução vitamínica (1,2% de ácido ascórbico, 0,03% pantotenato de cálcio, 0,015% niacina, 0,008% riboflavina, 0,004% tiamina HCl, 0,004% piridoxina HCl) em um volume total de 1,5 L de água.

A dieta foi cortada em blocos de 1 x 3 x 0,5 cm, que foram colocados no recipiente superior da gaiola. A cada dois dias, os ovos eram coletados junto com as fezes, e colocados em solução de CuSO_4 18%. Nesta solução os ovos flutuam enquanto que as fezes sedimentam. Os ovos foram então, coletados e desinfetados com uma solução de cloreto de benzalcônio 0,3% e distribuídos em placas de Petri, contendo a dieta anteriormente descrita, em grupos de aproximadamente 60 ovos. Após a eclosão, as larvas cresceram nestas placas até atingirem a idade adulta quando, foram recolhidos e transferidos para gaiola (Monnerat *et al.*, 2000).



Figura 2.1: Ilustração da criação de *A. grandis*. A: gaiola onde os insetos adultos são criados, mostrando o compartimento superior onde ficam os insetos e o compartimento inferior onde são depositados os ovos e as fezes dos insetos; B: Detalhe mostrando os adultos sendo criados em dieta artificial; C,D,E: Procedimento inicial de lavagem e separação dos ovos que estão misturados às fezes; G, H, I: Procedimento de lavagem dos ovos com sulfato de cobre para separação dos ovos; J: Detalhe, mostrando os ovos separados das fezes prontos para serem distribuídos em placas contendo dieta artificial; K: Placa contendo dieta artificial onde os ovos são distribuídos; L: Após algumas semanas é possível visualizar os casulos formados pelas larvas e pupas de *A. grandis*; M: Placa com insetos adultos.

2.3 – Bioensaio

Foram realizados dois tipos de bioensaio: o seletivo, ou discriminante, cujo objetivo foi determinar quais estirpes apresentavam atividade patogênica ao inseto, ou seja, capazes de causar no mínimo 50% de mortalidade de larvas; e o de dose, cujo objetivo foi determinar a concentração letal de cada estirpe para *A. grandis*.

A – Bioensaio seletivo:

Os bioensaios seletivos foram realizados incorporando-se 10 mL de cultura bacteriana esporulada em meio NYSM (13 g.L⁻¹ de caldo nutriente, 0.5 g.L⁻¹ extrato de

levedura, 6,8 g.L⁻¹ de KH₂PO₄, 0,3 g.L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O, 0,02 g.L⁻¹ de MnSO₄, 0,02 g.L⁻¹ de Fe₂(SO₄)₃, 0,02 g.L⁻¹ de ZnSO₄.7.H₂O, 0,02 g.L⁻¹ de CaCl₂, pH7.2.) por 48 h a 28 °C e 200rpm em agitador rotativo, a 35 mL de dieta artificial (descrita anteriormente) à temperatura de aproximadamente 50 °C. Após a incorporação da cultura esporulada na dieta, a mistura foi vertida em placas de Petri, e após solidificação da dieta, foram feitos 15 furos de aproximadamente 2 mm de diâmetro e em cada furo foi colocada uma larva neonata. Para cada cultura bacteriana foram testadas quatro placas, e uma placa foi deixada sem bactéria, como controle. A leitura foi feita sete dias após o bioensaio (Praça *et al.*, 2004).

B – Bioensaio de dose:

Para o bioensaio de dose-resposta foram selecionadas as estirpes que apresentaram os melhores resultados nos bioensaios seletivos. Estas foram liofilizadas após serem cultivadas por 72 h em meio NYSM a 28 °C e 200 rpm. Para isso, estes cultivos foram centrifugados a 12.800 x g por 30 minutos, a 4 °C (centrífuga BR4i, Jouan), congelados por 16h e liofilizados 18h em liofilizador Labconco modelo Lyphlock 18. Depois de liofilizado, o material foi pesado a fim de se obter as cinco doses (Tab. 1) usadas no bioensaio. Cada dose pesada foi dissolvida em solução aquosa de detergente (Tween a 0,01%) a fim de se obter uma suspensão mais homogênea. As suspensões foram incorporadas a 35 mL de dieta artificial e, em seguida, a dieta foi vertida em placas de Petri. Após solidificação, foram feitos 48 furos de aproximadamente 2 mm de diâmetro. Em cada furo foi colocada uma larva neonata. Foram testadas as cinco doses (de 0,1 a 1,5 mg.mL⁻¹) e mais um grupo controle. O bioensaio foi mantido em câmara de incubação com fotoperíodo de 14:10 (claro/escuro) e a uma temperatura de 27 °C. Uma semana após o ensaio, fez-se a leitura e determinou-se a CL₅₀ através de análise de Probits (Finney, 1971). *B. thuringiensis* subsp *tenebrionis* T08 017 obtida da coleção de *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus sphaericus* do Instituto Pasteur, Paris, foi usada como referência para isolados ativos contra insetos da ordem Coleoptera (Hofte *et al.*, 1987). O bioensaio foi repetido três vezes e a CL₅₀ foi comparada por ANOVA, usando o programa Sigmastat (Kuo *et al.*, 1992).

Tabela 2.1 – Concentração final da mistura esporo/cristal das estirpes usadas no bioensaio de dose-resposta para análise de atividade tóxica para *A. grandis*.

Dose	Mistura esporo/cristal liofilizada (mg)	Tween ⁸⁰ 0,01% (mL)	Dieta (mL)	Concentração final (mg.mL ⁻¹)
1	60	5,0	35,0	1,5
2	40	5,0	35,0	1,0
3	20	5,0	35,0	0,5
4	10	5,0	35,0	0,25
5	04	5,0	35,0	0,1

2.4 – Obtenção dos perfis protéicos

As estirpes que foram selecionadas para o bioensaio de dose tiveram seu perfil protéico determinado segundo protocolo descrito por Lecadet *et al.* (1991) com modificações. As estirpes foram crescidas em meio NYSM líquido por 72 h a 28 °C em incubador rotativo a 200 rpm. Quatro e meio mL da cultura foram centrifugados a 12000 x g por 15 min e o sedimento ressuspensionado em 1,5 mL de NaCl 5 mol.L⁻¹ e centrifugado novamente a 12000 x g por 15 min. O sedimento foi ressuspensionado em 1,5 mL de uma solução para inibição da atividade proteásica (1 mmol.L⁻¹ de PMSF; 40 mmol.L⁻¹ de EGTA; 100 mmol.L⁻¹ de EDTA), centrifugado a 12000 x g por 15 min e o sobrenadante descartado, repetindo-se esse procedimento por mais duas vezes. Após a última centrifugação, o sedimento foi ressuspensionado em 500 µL da solução de inibidores e estocado a -20 °C. Para comparação dos resultados, a estirpe *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* foi utilizada como padrão.

A análise do perfil protéico foi realizada através da eletroforese das proteínas em gel de poliacrilamida (SDS – PAGE 10%) (Laemmli, 1970) que permitiu conhecer o perfil das proteínas produzidas pelas estirpes. Foram aplicados 15 µL de cada amostra no gel, que foi corado e fixado em solução de 40% de metanol, 10% de ácido acético e azul de comassie a 0,1%, por cerca de 16 h, sob leve agitação e descorado em solução de 40% de metanol e 10% de ácido acético por 2 h, sob leve agitação.

2.5 - Obtenção do perfil molecular das estirpes

O DNA das estirpes foi obtido usando-se o protocolo descrito por Sambrook *et al.* (2001), com modificações. As estirpes foram crescidas por 16 h em placas de Petri contendo meio NYSM sólido. Após o crescimento, foram coletadas duas alçadas (usando-se alça de platina - Ø: 0,5 mm) da bactéria e estas foram colocadas em 200 µL de dH₂O estéril em um microtubo de 1,5 mL (Axigen). Após vigorosa agitação em “vortex”, as amostras foram congeladas por uma hora a -20 °C, fervidas a 100 °C por 10 min e resfriadas em gelo por dois minutos. Após este procedimento, as amostras foram centrifugadas a 14.000 x g por dois minutos e o sobrenadante transferido para um tubo novo e estéril. Ao sobrenadante, cerca de 200 µL, foi adicionado 500 µL de clorofane (25 fenol: 24 clorofórmio: 1 álcool isoamílico). As amostras foram agitadas vigorosamente em agitador do tipo “vortex” e centrifugadas a 14.000 x g por 5 min. A fase aquosa foi coletada e transferida para outro tubo. Adicionou-se a este, 500 µL de clorofil (24 clorofórmio: 1 álcool isoamílico) e as amostras foram agitadas vigorosamente em agitador do tipo “vortex” e novamente centrifugadas a 14.000 x g por 5 min. A fase aquosa foi coletada e transferida para outro tubo, onde foi adicionado 27 µL de NaCl 5mol.L⁻¹ e 1000 µL de etanol absoluto gelado e as amostras foram incubadas a -20 °C por ± 16h. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 14.000 x g por 20 min, o sobrenadante descartado e o sedimento lavado com 500 µL de etanol 70% gelado, por centrifugação a 14000 x g por 10 min. O etanol foi removido, o DNA seco à temperatura ambiente, ressuspendido em 50 µl de água Milli-Q[®] estéril contendo 1 µL de RNase A (10 mg.mL⁻¹) e incubado a 37 °C por duas horas. O DNA foi quantificado por espectrofotometria e 100 pg foram usados para reação em cadeia da polimerase (PCR) (2,5 U de *Taq* DNA polimerase, Invitrogen; 0,5 µmol.L⁻¹ de cada oligonucleotídeo; 2,5 mmol.L⁻¹ de cada deoxinucleotídeo num volume final de 50 µL de tampão 1X).

Diferentes oligonucleotídeos (Tab. 2.2) foram usados para obtenção do perfil molecular. As condições de PCR utilizadas foram as seguintes: um passo de desnaturação inicial por 2 min a 92 °C, 25 ciclos consistindo de (desnaturação a 92 °C por 1 min, anelamento (T_m descrito na tabela 2.2) por 1 min e extensão a 72 °C por 1 min) e extensão final a 72 °C por 5 min, para os oligonucleotídeos descritos por Ceron *et al.* (1994). Um

passo de desnaturação inicial por 2 min a 95 °C, 30 ciclos consistindo de (desnaturação a 95 °C por 1 min, anelamento (T_m descrito na tabela 2.2) por 1 min e extensão a 72 °C por 1 min) e extensão final a 72 °C por 5 min, para os oligonucleotídeos descritos por Ceron *et al.* (1995), Bravo *et al.* (1998) e Ibarra *et al.* (2003).

Tabela 2.2: Características dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR para caracterização dos genes *cry*.

Oligos	Sequencia	Genes	Bandas de DNA (pb)	Cristal protéico (kDa)	T_m (°C)
cry1 Ceron <i>et al.</i> , 1995	5'TGTAGAAGAGGAAGTCTATCCA (d) 5'TATCGGTTTCTGGGAAGTA (r)	<i>cryIAa</i>	272	133	48
		<i>cryIAb</i>	284	130	
		<i>cryIAc</i> ,	272	133	
		<i>cryIB</i> ,	290	140	
		<i>cryIC</i> , <i>cryID</i>	284	132-134	
		<i>cryIEa</i>	275	133	
		<i>cryIEb</i>	290	133	
		<i>cryIFa</i>	284	132-134	
cry1 esp. Ceron <i>et al.</i> , 1994	5'TGTAGAAGAGGAAGTCTATCCA (d) 5'TTGGAGCTCTCAAGGTGTAA (r)	<i>cryIAa</i>	246	133	53
cry1 esp. Ceron <i>et al.</i> , 1994	5'CAGCCGATTTACCTTCTA (d) 5'TTGGAGCTCTCAAGGTGTAA (r)	<i>cryIAd</i>	171	133	53
cry1 esp. Ceron <i>et al.</i> , 1994	5'AACAACATCTGTTCTTGAC (d) 5'CTCTTATTATACTTACTACTAC (r)	<i>cryIAb</i>	216	130	53
cry1 esp. Ceron <i>et al.</i> , 1994	5'GTTAGATTAAATAGTAGTGG (d) 5'TGTAGGTGGTACTGTTATTG (r)	<i>cryIAc</i>	180	133	53
cry1 esp. Ceron <i>et al.</i> , 1994	5'CTTCATCACGATGGAGTAA (d) 5'CATAATTTGGTCGTTCTGTT (r)	<i>cryIB</i>	367	140	53
cry1 esp. Ceron <i>et al.</i> , 1994	5'AAAGATCTGGAACACCTTT (d) 5'CAAACCTCTAAATCCTTTTCAC (r)	<i>cryIC</i>	130	134	53
cry1 esp. Ceron <i>et al.</i> , 1994	5'CTGCAGCAAGCTATCCAA (d) 5'ATTTCAATTGTCAAGGCCTG (r)	<i>cryID</i>	290	132	53
cry1 esp. Martins <i>et al.</i> , 2008	5'GTATAAGTGGAGGGATCCATATG (d) 5'GGATCCCTACATGTTACGCTT (r)	<i>cryII</i>	2100	72	54
cry2 Bravo <i>et al.</i> , 1998	5'GAGTTTAATCGACAAGTAGATAATTT3' (d) 5'GGAAAAGAGAATATAAAAATGGCCAG3' (r)	<i>cry2</i>	526	72	51

Oligos	Sequencia	Genes	Bandas de DNA (pb)	Cristal protéico (kDa)	Tm
cry3 Ceron <i>et al.</i> , 1995	5'TTAACCGTTTTTCGCAGAGA (d) 5'TCCGCACTTCTATGTGTCCAAG (r)	<i>cry3A</i>	703	73	48
		<i>cry3B</i> , <i>cry3C</i>	709		
		<i>cry3Cb</i> ,	694		
		<i>cry3Cc</i>	718		
		<i>cry3D</i>	652		
		<i>cry3F</i> <i>cry3G</i>	733		
cry4 esp. Ibarra <i>et al.</i> , 2003	5'TCAAAGATCATTTCAAAATTACATG (d) 5'CGGCTTGATCTATGTCATAATCTGT (r)	<i>cry4A</i>	459	72	50
		<i>cry4B</i>	321	72	50
cry4 esp. Ibarra <i>et al.</i> , 2003	5'CGTTTTCAAGACCTAATAATATAATACC (d) 5'CGGCTTGATCTATGTCATAATCTGT (r)				
		cry5+12+ 14+21 Bravo <i>et al.</i> , 1998	5'TTCGTA AATTGGTCAATCAAGCAA (d) 5'AAGACCAAATTCAATACCAGGGTT (r)	<i>cry12</i> <i>cry14</i> <i>cry21</i>	477 483 489
cry8 Bravo <i>et al.</i> , 1998	5'ATGAGTCCAAATAATCTAAATG (d) 5'TTGATTAATGAGTTCTTCCACTCG (r)				
		cry9 esp. Bravo <i>et al.</i> , 1998	5'TCATTGGTATAAGAGTTGGTGATAGAC (d) 5'CCGCTTCCAATAACATCTTTT (r)	<i>cry9B</i>	402
cry9 esp. Bravo <i>et al.</i> , 1998	5'CTGGTCCGTTCAATCC (d) 5'CCGCTTCCAATAACATCTTTT (r)				
		cry10 Ibarra <i>et al.</i> , 2003	5'TCAATGCTCCATCCAATG (d) 5'CTTGATATAGGCCTTCCTCCG (r)	<i>cry10</i>	348
cry11 Bravo <i>et al.</i> , 1998	5'TTAGAAGATACGCCAGATCAAGC (d) 5'CATTCTACTTGAAGTTGTTAATCCC (r)				
		cry13 Bravo <i>et al.</i> , 1998	5'CTTTGATTATTTAGGTTTGTGATTC (d) 5'TTGTAGTACAGGCTTGTGATTC (r)	<i>cry13</i>	313
cry17+27 Ibarra <i>et al.</i> , 2003	5'CATTGTTCTACTTGGTATAA (d) 5'GATACAATTACATCTCCTCCTGTA (r)				
		cry19+39 Ibarra <i>et al.</i> , 2003	5'AAGCTGCGAATCTGCATTTACTTTT (d) 5'CTCATAATTTCCGTCCATAAAT (r)	<i>cry19Aa</i> <i>cry19Ba</i> <i>cry39</i>	616 631 619
cry25 Ibarra <i>et al.</i> , 2003	5'GGCTTCTAGATCAGGAGATGG (d) 5'CATCATAATCAGAGCGCAGG (r)				
		cry24+40 Ibarra <i>et al.</i> , 2003	5'TTATCAATGTTAAGGGATGC (d) 5'ACTGGATCTGTGTATATTTTCCTAG (r)	<i>cry24Aa</i> <i>cry40Aa</i>	304 366
cry29 Ibarra <i>et al.</i> , 2003	5'TCAGCTCCAATAACTGGTG (d) 5'GCATGTCATCCCCTTGTCTA (r)				

Oligos	Sequencia	Genes	Bandas de DNA (pb)	Cristal protéico (kDa)	Tm
cry30 Ibarra <i>et al.</i> , 2003	5'AACTCACACATCCTCCATCG (d) 5'ATCGAAGGCAATCATTTCG (r)	<i>cry30</i>	265	77,8	50
cry32 Ibarra <i>et al.</i> , 2003	5'TGGTCGGGAGAGAATGGATGGA (d) 5'ATGTTTGCACACCATTTTC (r)	<i>cry32Aa</i> <i>cry32Ba</i> <i>cry32Ca</i> <i>cry32D</i>	677 676	82	54
cyt1 Bravo <i>et al.</i> , 1998	5'AACCCCTCAATCAACAGCAAGG(d) 5'GGTACACAATACATAACGCCACC(r)	<i>cyt1Aa</i> <i>cyt1Ab</i>	522 525	27	51
cyt2 Ibarra <i>et al.</i> , 2003	5'ATTACAAATTGCAAATGGTATTCC (d) 5'TTTCAAACATCCACAGTAATTTCAAATGC (r)	<i>cyt2Aa</i> <i>cyt2Ba</i> <i>cyt2Bb</i> <i>cyt2Ca</i>	355	29	50

2.6 – Caracterização morfológica por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As estirpes selecionadas foram caracterizadas também, quanto à morfologia de suas inclusões cristalinas. Para tal, 100 µL do cultivo final esporulado de cada estirpe, foram centrifugado a 10.000 x g por 10 min, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi depositado sobre suportes metálicos “stubs”. As amostras foram secas ao ar e cobertas com ouro por 180 s, utilizando-se metalizador EMITECH modelo K550 e observadas em microscópio eletrônico de varredura Zeiss modelo DSM 962.

2.7 – Detecção de β-exotoxina produzida por *B. thuringiensis*

Espinasse *et al.* (2002) relatou que estirpes de *B. thuringiensis* que possuíam atividade para *A. grandis*, o faziam por expressar também β-exotoxina, o que acarretaria na mortalidade do inseto. Para verificarmos se as estirpes selecionadas nos ensaios expressavam tal toxina, foi realizado um ensaio de atividade para esta toxina de acordo com Tsuchiya *et al.* (2002). Para tal, as estirpes foram crescidas em frascos do tipo Erlenmeyer de 50 mL, contendo 10 mL de meio nutriente “Broth” (5 g.L⁻¹ de peptona; 5 g.L⁻¹ de extrato de carne; 5g.L⁻¹ de NaCl; pH 7,6), com agitação constante de 200 rpm a, 28 °C, por 48 h. A cultura foi centrifugada a 14.000 x g por 10 min. O sobrenadante foi filtrado (filtro Millipore 0,45 µm) e aquecido a 100 °C por 10 min. Cem microgramas do sobrenadante

tratado com choque-térmico foi incorporado à dieta e procedeu-se ensaio conforme descrito na seção 2.3 (A). Como grupo controle não testado, foi usado 100 microgramas de meio nutriente broth tratado com choque-térmico.

3. Resultados

3.1 – Bioensaios

Dentre as 215 estirpes testadas, cinco (S325, S601, S785, S811 e S1806) apresentaram melhores resultados de toxicidade contra as larvas testadas (Tab. 2.3) e, foram selecionadas para o bioensaio de dose.

Tabela 2.3 – Resultados de bioensaio seletivo de estirpes de *B. thuringiensis* contra larvas neonatas de *A. grandis* a partir de uma dose diagnóstica.

Isolado	Mortalidade (%)	Estado de origem	Isolado	Mortalidade (%)	Estado de origem
S8	21,7	Espírito Santo – BR	S853	51,6	Santa Catarina – BR
S10	33,4	Mato Grosso do Sul – BR	S854	79,0	Santa Catarina – BR
S13	51,7	Mato Grosso do Sul – BR	S855	73,3	Santa Catarina – BR
S18	46,7	Mato Grosso do Sul – BR	S859	51,6	Rio Grande do Sul – BR
S29	51,7	Espírito Santo – BR	S861	50,0	Bahia – Brhia – BR
S33	41,7	Espírito Santo – BR	S874	71,6	Bahia – Brhia – BR
S34	38,4	Espírito Santo – BR	S893	66,8	Mato Grossol – BR
S38	43,4	Espírito Santo – BR	S894	53,3	Mato Grossol – BR
S39	60,0	Espírito Santo – BR	S897	75,0	Mato Grossol – BR
S41	55,0	Espírito Santo – BR	S898	56,0	Santa Catarina – BR
S48	56,6	Distrito Federal – BR	S910	55,0	São Paulo – BR
S62	65,0	Santa Catarina – BR	S916	58,1	Paraná – BR
S65	65,0	Santa Catarina – BR	S919	55,0	Paraná – BR
S66	58,4	Santa Catarina – BR	S920	50,0	Minas Gerais – BR
S67	50,0	Santa Catarina – BR	S935	76,6	Paraíba – BR
S69	66,7	Rio Grande do Sul – BR	S939	61,6	Paraíba – BR
S70	60,0	São Paulo – BR	S946	50,0	São Paulo – BR
S72	75,0	Paraná – BR	S965	50,0	Mato Grosso do Sul – BR
S73	60,0	Goiás – BR	S997	56,7	Mato Grossol – BR
S74	51,7	Goiás – BR	S1016	51,6	Mato Grossol – BR
S75	61,7	Goiás – BR	S1018	71,6	Mato Grossol – BR
S76	60,0	Goiás – BR	S1020	73,3	Mato Grossol – BR

Isolado	Mortalidade (%)	Estado de origem	Isolado	Mortalidade (%)	Estado de origem
S78	60,0	Goiás – BR	S1021	75,0	Mato Grosso do Sul – BR
S79	31,7	Goiás – BR	S1026	79,0	Mato Grosso – BR
S80	13,4	Goiás – BR	S1044	45,0	Goiás – BR
S81	50,0	Goiás - BR	S1045	43,0	Mato Grosso - BR
S82	60,0	Goiás - BR	S1046	50,0	Goiás - BR
S83	60,0	Goiás - BR	S1047	33,3	Paraná - BR
S84	78,8	Goiás - BR	S1051	33,3	Amazonas - BR
S86	50,0	Goiás - BR	S1052	33,3	Rondônia - BR
S88	41,7	Rondônia - BR	S1055	36,6	Rondônia - BR
S90	56,7	Minas Gerais - BR	S1060	46,6	Amazonas - BR
S92	56,7	Minas Gerais - BR	S1063	63,3	Amazonas - BR
S93	53,3	Minas Gerais - BR	S1064	10,0	Amazonas - BR
S94	28,4	Minas Gerais - BR	S1065	10,0	Amazonas - BR
S95	26,7	Minas Gerais - BR	S1066	10,0	Amazonas - BR
S96	40,0	Minas Gerais - BR	S1067	10,0	Rondônia - BR
S97	30,0	Minas Gerais - BR	S1068	10,0	Pará - BR
S98	36,7	Mato Grosso - BR	S1071	10,0	Pará – BR
S99	53,3	Mato Grosso - BR	S1072	10,0	Pará – BR
S100	55,0	Mato Grosso - BR	S1075	10,0	Pará - BR
S101	58,4	Mato Grosso - BR	S1076	10,0	Pará – BR
S105	56,7	São Paulo - BR	S1077	10,0	Pará – BR
S106	26,7	São Paulo - BR	S1079	10,0	Rondônia - BR
S108	61,7	Mato Grosso do Sul - BR	S1080	10,0	Pará – BR
S147	66,6	Minas Gerais - BR	S1081	10,0	Pará – BR
S148	56,7	Minas Gerais - BR	S1082	35,0	Pará – BR
S158	76,6	Goiás - BR	S1083	48,3	Pará - BR
S198	55,0	Pernambuco - BR	S1085	48,3	Pará – BR
S287	60,0	Bahia - BR	S1086	55,0	Pará – BR
S299	58,3	Bahia - BR	S1087	30,0	Pará – BR
S309	63,4	Pernambuco - BR	S1089	10,0	Pará – BR
S324	66,4	Rondônia - BR	S1090	48,3	Pará – BR
S325 ^a	88,0	Rondônia - BR	S1092	48,3	Rondônia - BR
S332	66,0	Rondônia - BR	S1093	16,7	Rondônia - BR
S335	65,0	Rondônia - BR	S1094	41,7	Rondônia - BR
S339	63,4	Rondônia - BR	S1096	60,0	Rondônia - BR
S340	63,4	Rondônia - BR	S1098	63,3	Rondônia - BR

Isolado	Mortalidade (%)	Estado de origem	Isolado	Mortalidade (%)	Estado de origem
S381	53,4	Goiás - BR	S1099	53,3	Rondônia - BR
S395	71,6	Paraná - BR	S1101	65,0	Rondônia - BR
S397	55,0	Paraná - BR	S1102	43,3	Rondônia - BR
S400	55,0	São Paulo - BR	S1104	36,6	Rondônia - BR
S415	51,0	Goiás - BR	S1105	10,0	Rondônia - BR
S420	61,7	Goiás - BR	S1107	10,0	Rondônia - BR
S421	51,7	Goiás - BR	S1108	10,0	Rondônia - BR
S422	58,7	Goiás - BR	S1111	10,0	Pará - BR
S428	61,7	Goiás - BR	S1113	10,0	Amazonas - BR
S466	56,7	São Paulo - BR	S1114	10,0	Amazonas - BR
S472	56,7	Mato Grosso - BR	S1115	10,0	Amazonas - BR
S473	56,6	Minas Gerais - BR	S1117	10,0	Amazonas - BR
S497	51,7	Pará - BR	S1119	10,0	Acre - BR
S518	51,0	Minas Gerais - BR	S1120	10,0	Acre - BR
S520	65,0	São Paulo - BR	S1121	10,0	Acre - BR
S570	50,0	Santa Catarina - BR	S1122 ^b	70,0	Argentina
S593	55,0	Rondônia - BR	S1123	58,3	Acre - BR
S597	56,6	Distrito Federal - BR	S1125	10,0	Pará - BR
S600	60,0	Mato Grosso do Sul - BR	S1129	10,0	Pará - BR
S601 ^a	100,0	São Paulo - BR	S1131	10,0	Acre - BR
S605	58,3	Paraná - BR	S1132	50,0	Acre - BR
S615	53,3	Paraná - BR	S1133	10,0	Acre - BR
S617	60,5	Paraná - BR	S1193	31,7	Amazonas - BR
S640	61,6	São Paulo - BR	S1194	38,3	Tocantins - BR
S646	55,0	Mato Grosso do Sul - BR	S1195	10,0	Tocantins - BR
S656	60,5	Goiás - BR	S1196	10,0	Tocantins - BR
S672	58,3	Mato Grosso do Sul - BR	S1197	10,0	Tocantins - BR
S690	53,3	Rondônia - BR	S1199	10,0	Tocantins - BR
S699	56,8	Amazonas - BR	S1200	10,0	Tocantins - BR
S710	60,0	Alagoas - BR	S1201	10,0	Bahia - BR
S711	56,6	Pernambuco - BR	S1211	10,0	Bahia - BR
S721	51,6	Sergipe - BR	S1213	10,0	Bahia - BR
S765	60,0	Santa Catarina - BR	S1214	10,0	Bahia - BR
S780	63,7	Amazonas - BR	S1215	10,0	Bahia - BR
S785	83,3	Minas Gerais - BR	S1264	66,6	São Paulo - BR

Isolado	Mortalidade (%)	Estado de origem	Isolado	Mortalidade (%)	Estado de origem
S813	65,0	Rio Grande do Sul - BR	S1269	75,0	São Paulo - BR
S820	53,3	Santa Catarina - BR	S1271	48,3	São Paulo - BR
S821	51,67	Paraná - BR	S1329	60,0	Ceará - BR
S824	53,3	Paraná - BR	S1342	75,0	Ceará - BR
S826	58,3	Paraná - BR	S1350	56,7	Ceará - BR
S827	60,0	Paraná - BR	S1361	21,7	Maranhão - BR
S828	56,6	Paraná - BR	S1365	56,71	Maranhão - BR
S829	65,0	Paraná - BR	S1450	43,3	Rio Grande do Sul - BR
S830	56,6	Santa Catarina - BR	S1451	66,6	Distrito Federal - BR
S831	65,0	Santa Catarina - BR	S1806 ^a	95,0	Minas Gerais - BR
S838	63,8	Rio Grande do Sul - BR	S1971	50,0	Distrito Federal - BR
S845	53,3	Bahia - BR	S1972	65,0	Distrito Federal - BR
S848	60,0	Santa Catarina - BR	S1973	60,0	Distrito Federal - BR

^a estirpes escolhidas para bioensaio de dose-resposta;

^b estirpe padrão descrita para insetos coleópteros *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis*.

As estirpes, S325, S601, S785, S811 e S1806, avaliadas no bioensaio de dose foram agrupadas em quatro grupos estatisticamente distintos (ANOVA $H=16.62$; g.l.= 6; $p=0.011$).

A estirpe S601 foi classificada no grupo A (com base no intervalo de confiança) e apresentou o melhor resultado de CL_{50} , que foi de $0,15 \text{ mg.mL}^{-1}$, a estirpe referência (*B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis*) e a S1806 foram classificadas como pertencentes ao grupo B com CL_{50} respectivamente de $0,32 \text{ mg.mL}^{-1}$ e $0,30 \text{ mg.mL}^{-1}$, não diferindo estatisticamente entre si. O grupo C foi formado pela estirpe *B. thuringiensis* IPS82 subsp. *israelensis*, obtido da Coleção de *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus sphaericus* Meyer e Neide do Instituto Pasteur, Paris, que é a estirpe padrão para insetos da ordem Diptera, apresentou uma CL_{50} de $0,74 \text{ mg.mL}^{-1}$. As demais estirpes S811, S785 e S325 foram classificadas como grupo D, apresentando respectivamente, CL_{50} de $1,5 \text{ mg.mL}^{-1}$, $3,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ e $8,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ (Tab. 2.4).

Tabela 2.4: Concentração letal (CL₅₀) das estirpes de *B. thuringiensis* contra *A. grandis*.

Estirpe	CL ₅₀ (mg.mL ⁻¹) ^a
S601	0,15 (0,11 – 0,17) ^{b,A}
S1806	0,30 (0,25 – 0,36) ^B
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>tenebrionis</i> (S1122)	0,32 (0,23 – 0,44) ^B
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i> IPS82	0,74 (0,61 – 0,91) ^C
S811	1,5 (0,97 – 2,8) ^D
S785	3,5 (1,8 – 16,0) ^D
S325	8,1 (2,9 – 16,0) ^D

^a – Os resultados são expressos como a média em três bioensaios independentes.

^b – os números entre parêntesis correspondem ao intervalo de confiança a 95%.

A, B, C, D – agrupamento estatístico, com base no intervalo de confiança a 95%, das estirpes testadas;

3.2 – Análise do perfil protéico dos cristais das estirpes selecionadas

A estirpe S601 apresentou uma forte banda de 140 kDa e outras quatro bandas de menor massa molecular. A estirpe S1806 também se destacou por se tratar de uma estirpe de *B. thuringiensis israelensis* (Bti), com atividade descrita para dípteros (Monnerat *et al.*, 2006) e a S811 possui uma banda de 130 kDa e outra de 60 kDa. As demais estirpes apresentaram um perfil protéico semelhante ao padrão, *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* (Fig. 2.2)

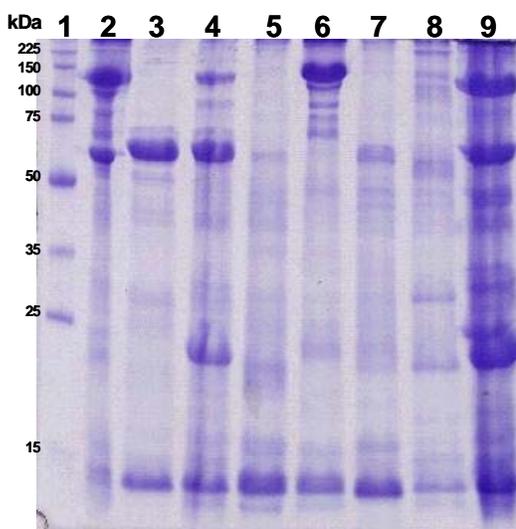


Figura 2.2: Perfil protéico das estirpes selecionadas de *B. thuringiensis*. A preparação esporo/cristal das culturas foi submetida à eletroforese em gel desnaturalizante de bis-acrilamida 10%. 1: marcador de massa molecular rainbow (GE); 2: *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (HD-1); 3: *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis*; 4: *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (IPS82); 5: S325; 6: S601; 7: S785; 8: S811 e 9: S1806. PM em kDa.

3.3 – Análise do perfil molecular das estirpes selecionadas

A estirpe S601 apresentou produto de amplificação para o gene *cry1B* (Fig. 2.3), a S1806 apresentou produto de amplificação para os genes esperados para uma estirpe de Bti (*cry4A*, *cry4B*, *cry10*, *cry11*, *cyt1*, *cyt2*) (Fig. 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8 e 2.9, respectivamente). A estirpe S811 apresentou produto de amplificação para os genes *cry1Ab*, *cry1I* e *cry8* (Fig. 2.10, 2.11 e 2.12, respectivamente). As estirpes S785 e S325 apresentaram produto de amplificação para o gene *cry2* (Fig. 2.13). Nenhuma das estirpes apresentou produto de PCR para o gene *cry3*, que possui atividade descrita para coleópteros (dados não mostrados).

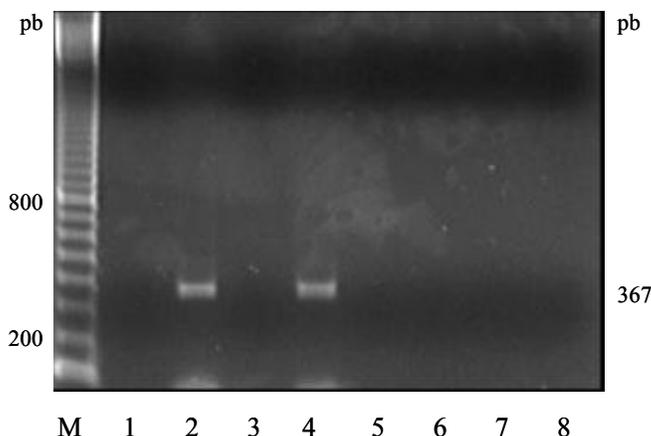


Figura 2.3: Análise dos produtos de PCR obtidos para o gene *cry1B*. Eletroforese em gel de agarose (1,0%) mostrando em M: marcador de peso molecular 100bp DNA Ladder (GE); 1: controle negativo; 2: controle positivo (Btk); 3: S325; 4: S601; 5: S785; 6: S811; 7: S1806; 8: S1989.

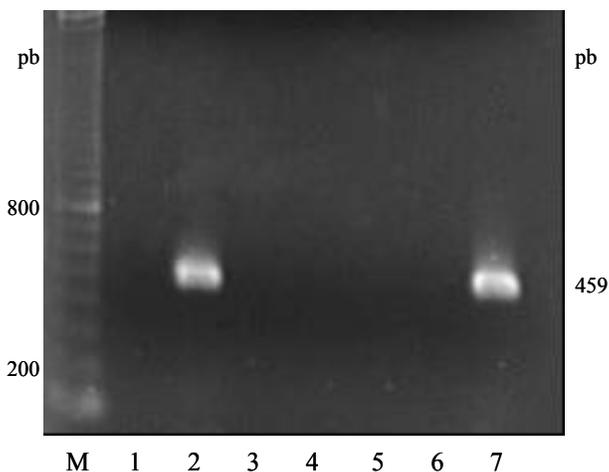


Figura 2.4: Análise dos produtos de PCR obtidos para o gene *cry4A*. Eletroforese em gel de agarose (1,0%) mostrando em M: marcador de peso molecular 100bp DNA Ladder (GE); 1: controle negativo; 2: controle positivo (Bti); 3: S325; 4: S601; 5: S785; 6: S811; 7: S1806.

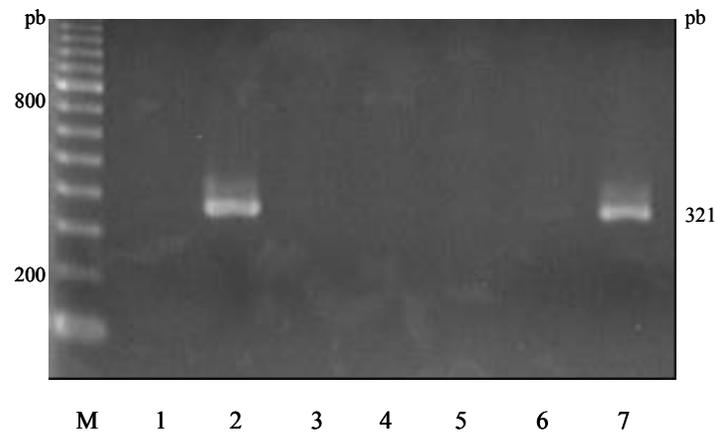


Figura 2.5: Análise dos produtos de PCR obtidos para o gene *cry4B*. Eletroforese em gel de agarose (1,0%) mostrando em M: marcador de peso molecular 100bp DNA Ladder (GE); 1: controle negativo; 2: controle positivo (Bti); 3: S325; 4: S601; 5: S785; 6: S811; 7: S1806.

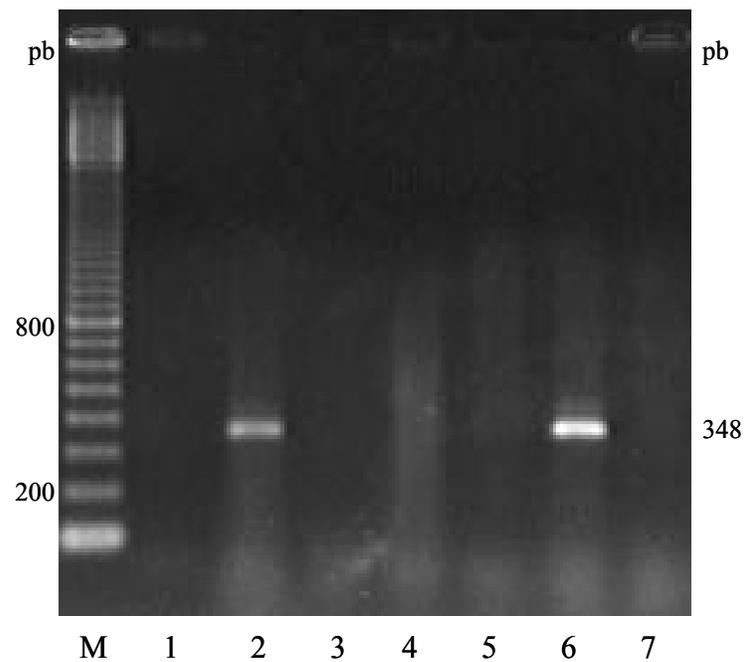


Figura 2.6: Análise dos produtos de PCR obtidos para o gene *cry10*. Eletroforese em gel de agarose (1,0%) mostrando em M: marcador de peso molecular 100bp DNA Ladder (GE); 1: controle negativo; 2: controle positivo (Bti); 3: S325; 4: S601; 5: S785; 6: S1806; 7: S811.

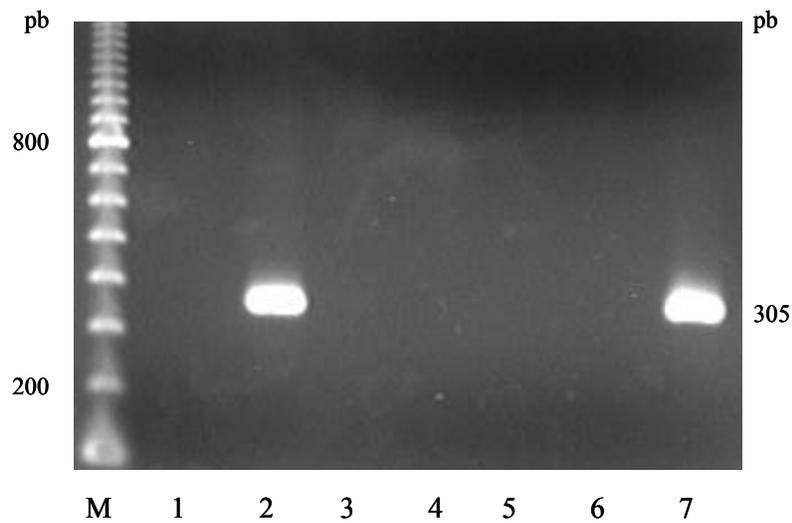


Figura 2.7: Análise dos produtos de PCR obtidos para o gene *cryII*. Eletroforese em gel de agarose (1,0%) mostrando em M: marcador de peso molecular 100bp DNA Ladder (GE); 1: controle negativo; 2: controle positivo (Bti); 3: S325; 4: S601; 5: S785; 6: S811; 7: S1806.

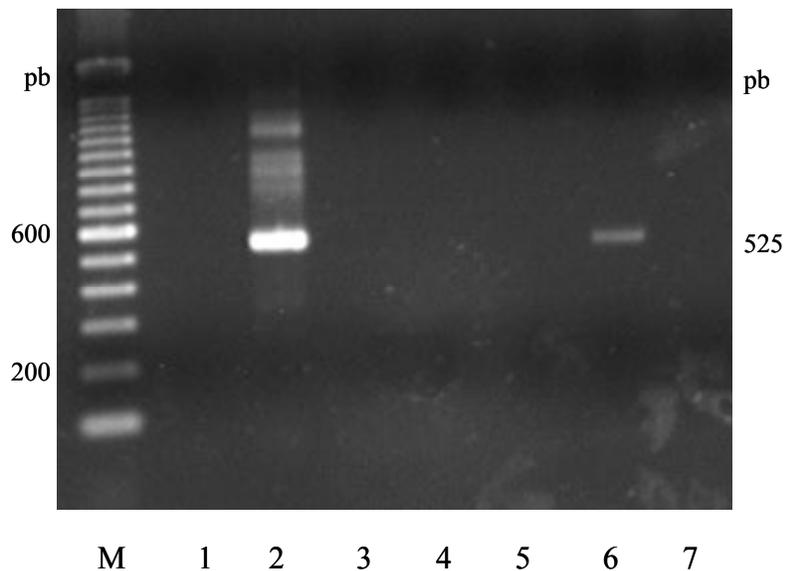


Figura 2.8: Análise dos produtos de PCR obtidos para o gene *cytI*. Eletroforese em gel de agarose (1,0%) mostrando em M: marcador de peso molecular 100bp DNA Ladder (Invitrogen); 1: controle negativo; 2: controle positivo (Bti); 3: S325; 4: S601; 5: S785; 6: S1806; 7: S811.

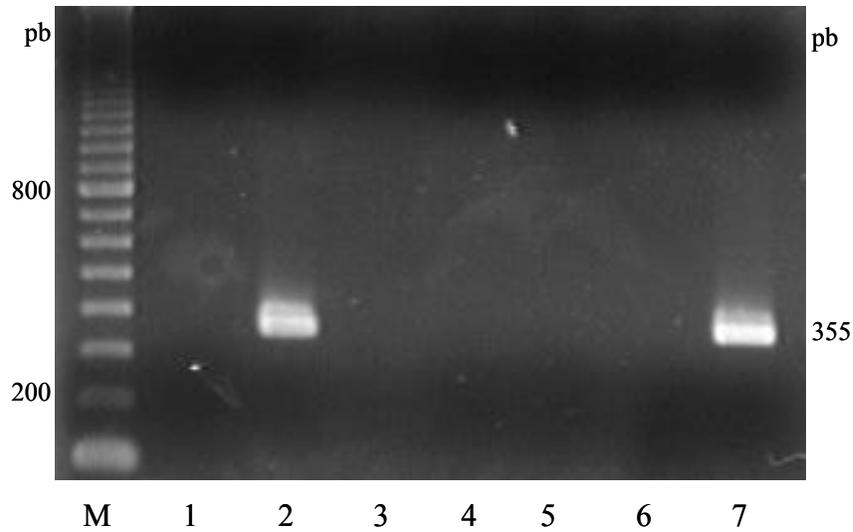


Figura 2.9: Análise dos produtos de PCR obtidos para o gene *cyt2*. Eletroforese em gel de agarose (1,0%) mostrando em M: marcador de peso molecular 100bp DNA Ladder (GE); 1: controle negativo; 2: controle positivo (Bti); 3: S325; 4: S601; 5: S785; 6: S811; 7: S1806.

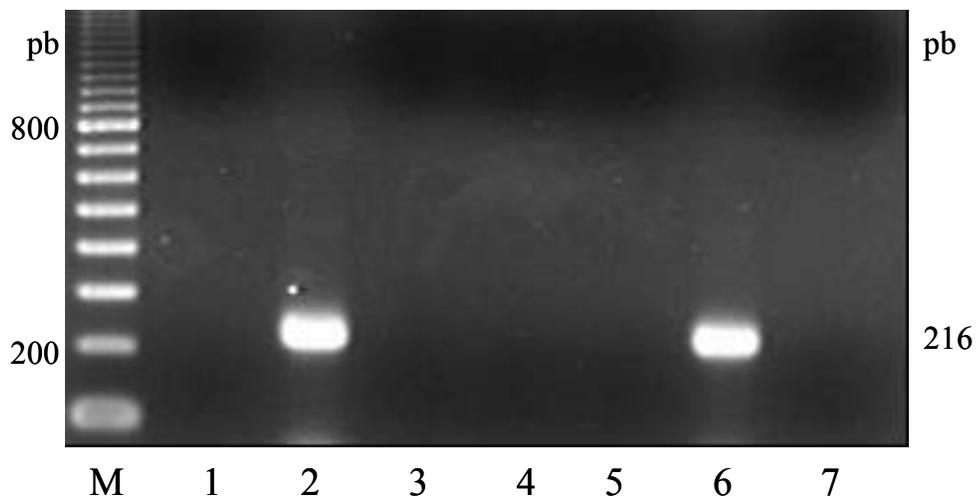


Figura 2.10: Análise dos produtos de PCR obtidos para o gene *cryIAb*. Eletroforese em gel de agarose (1,0%) mostrando em M: marcador de peso molecular 100bp DNA Ladder (GE); 1: controle negativo; 2: controle positivo (Btk); 3: S601; 4: S325; 5: S785; 6: S811; 7: S1806.

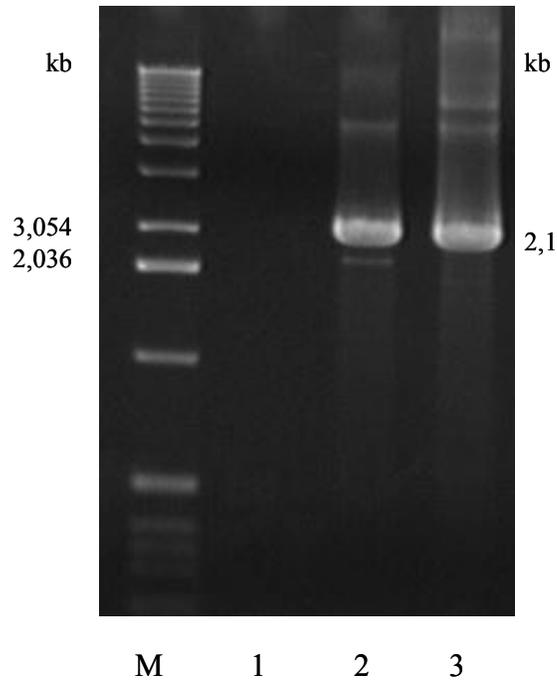


Figura 2.11: Análise dos produtos de PCR obtidos para o gene *cryII*. Eletroforese em gel de agarose (1,0%) mostrando em M: marcador de peso molecular 1kb DNA Ladder (GE); 1: controle negativo; 2: controle positivo (Btk); 3: S811.

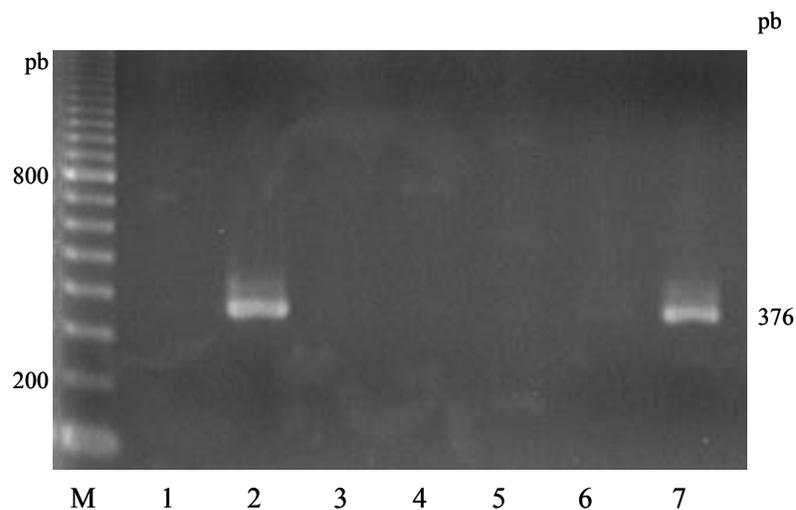


Figura 2.12: Figura 12 – Análise dos produtos de PCR obtidos para o gene *cry8*. Eletroforese em gel de agarose (1,0%) mostrando em M: marcador de peso molecular 100bp DNA Ladder (GE); 1: controle negativo; 2: controle positivo (Btt); 3: S325; 4: S601; 5: S785; 6: S1806; 7: S811.

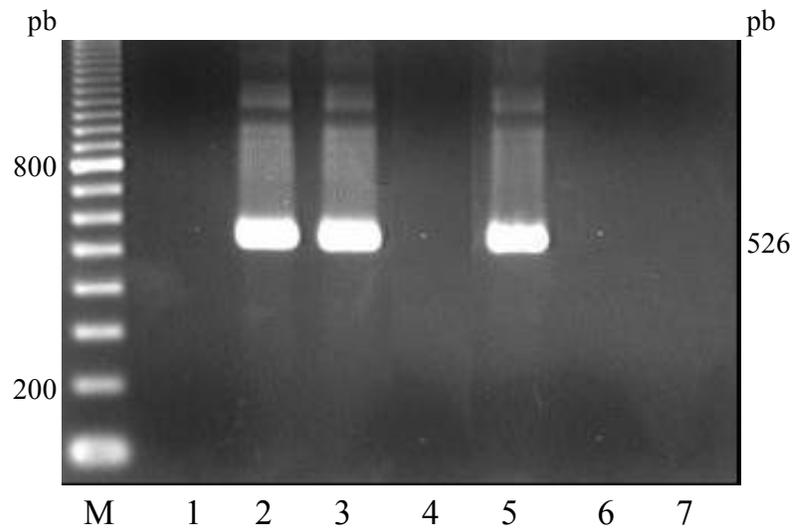


Figura 2.13: Análise dos produtos de PCR obtidos para o gene *cry2*. Eletroforese em gel de agarose (1,0%) mostrando em M: marcador de peso molecular 100bp DNA Ladder (GE); 1: controle negativo; 2: controle positivo (Btk); 3: S325; 4: S601; 5: S785; 6: S811; 7: S1806.

3.4 – Caracterização morfológica por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A caracterização morfológica por microscopia eletrônica de varredura (Fig 2.14) mostrou que as estirpes apresentam, em geral, cristais de formato arredondado com exceção da S601 e da S811 que possuem cristais bipiramidais (Fig. 2,14A e F).

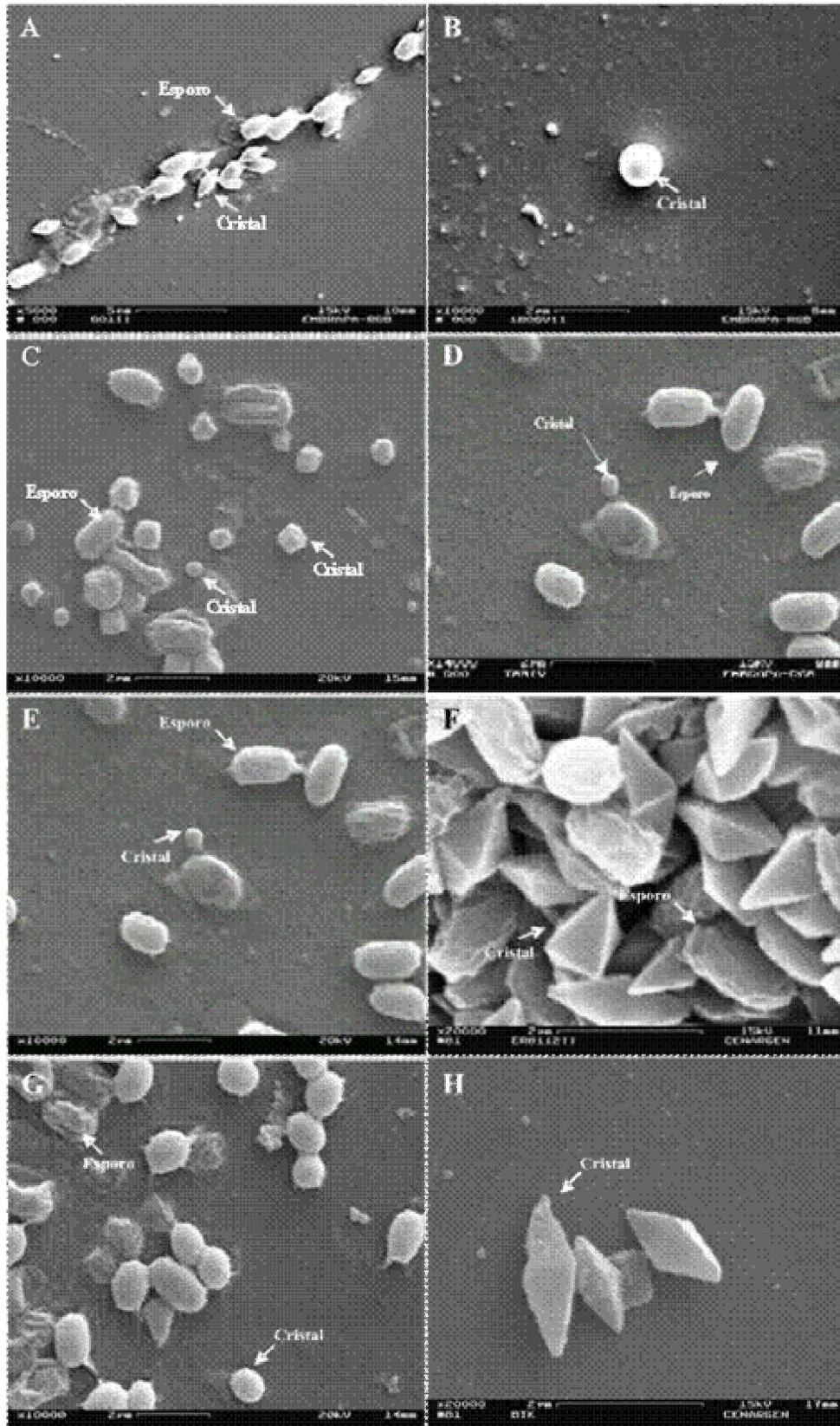


Figura 2.14: Caracterização morfológica, por MEV, dos cristais das estirpes selecionadas que apresentaram atividade para *A. grandis*. A: S601; B: S1806; C: *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis*; D: S325; E: S785; F: S811; G: *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* e H: *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*.

3.5 – Detecção de β – exotoxina nas estirpes tóxicas a *A. grandis*

Para todas as estirpes selecionadas, o ensaio foi negativo, apresentando mortalidade inferior a 10% (dados não mostrados) e indica que a expressão de β -exotoxina, é considerada ausente, nas estirpes testadas.

4. Discussão

A estirpe S601 além de se destacar pelo seu resultado de CL_{50} ($0,15 \text{ mg/mL}^{-1}$), apresentou um perfil protéico bastante diferenciado da estirpe padrão *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis*, com uma forte banda de 140 kDa. A presença desta proteína de maior massa molecular é consistente com a presença do gene *cry1B* (Tab. 2.3), que foi detectado por PCR, indicando ser esta uma potencial proteína com atividade tóxica para *A. grandis*. Espinasse *et al.* (2002), demonstraram que estirpes de *B. thuringiensis* que expressavam a proteína Cry1B, possuíam atividade contra *A. grandis*, porém, a atividade destas estirpes estava relacionada à produção de β -exotoxinas. Neste trabalho, foi demonstrado que das cinco estirpes que apresentaram atividade para este inseto, nenhuma, expressava β -exotoxina, confirmando que esta atividade está relacionada ao conteúdo de proteínas Cry de cada uma das estirpes.

A estirpe S1806, que foi sorotipada como *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, exibiu perfil protéico e molecular semelhante à estirpe *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* IPS82 (Bti), com atividade descrita para insetos da ordem Diptera (Monnerat *et al.*, 2006) e apresentou altos níveis de toxicidade ($CL_{50} = 0,3 \text{ mg/ml}^{-1}$), semelhante à estirpe padrão para insetos da ordem Coleoptera (*B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis*) ($CL_{50} = 0,32 \text{ mg/ml}^{-1}$), para larvas de *A. grandis*, corroborando alguns trabalhos já realizados por outros grupos de pesquisa, que têm demonstrando a atividade de estirpes de Bti ativas contra insetos da ordem Coleoptera (Méndez-Lopez *et al.*, 2003). A estirpe padrão *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* IPS82 também exibiu alto nível de toxicidade ($CL_{50} = 0,74 \text{ mg/ml}^{-1}$), em um nível inferior à estirpe S1806. A toxicidade da estirpe S811 é devida, provavelmente, à presença das proteínas Cry11 e Cry8, que têm sido descritas como tóxicas para as larvas de

coleópteros (Martins *et al.*, 2008; Abad *et al.*, 2001; Tailor *et al.*, 1992). As estirpes S785 e S325 apresentaram os maiores valores de CL_{50} ($3,5 \text{ mg/ml}^{-1}$ e $8,1 \text{ mg/ml}^{-1}$ respectivamente), provavelmente, por estas expressarem somente a proteína Cry2, que nunca foi demonstrada como tóxica para esta ordem de insetos. Entretanto, nenhuma das estirpes apresentou produto de amplificação para o gene *cry3*, cujo produto, foi descrito anteriormente como tóxico para insetos coleópteros (Bravo *et al.*, 1998).

Os ensaios apresentados neste trabalho mostraram que das 215 estirpes testadas, duas as estirpes S601 e S1806 possuem alto potencial para o controle do bicudo do algodoeiro, uma vez que seus resultados de CL_{50} foram melhores que o do padrão recomendado para insetos da ordem Coleoptera.

Frankenhuyzen (2009), em sua recente revisão, relatou que um total de 47 toxinas Cry já foram testadas contra 39 espécies de coleópteros. As espécies ou gêneros mais comumente testados foram *Diabrotica spp.* (24,0%), *Leptinotarsa decemlineata* (20,8%), *Crysmela. scripta* (10,2%), *Holotrichia* (5,8%), *Anomala* (4,3%), *Tribolium castaneum* (3,7%) e *A. grandis* (3,7%), de um total de 72,7% dos coleópteros testados. A família Chrysomelidae foi a mais freqüentemente testada (62,6%), seguida por Scarabeidae (17,1%), Tenebrionidae (8,6%), Curculionidae (5,3%), e Cerambycidae (3,2%), que em conjunto representam 96,8% de todos os bioensaios.

Várias toxinas têm sido descritas como tóxicas para insetos da ordem Coleoptera, Cry1Ba para *L. decemlineata*, *C. scripta*, *A. grandis* (Bradley *et al.*, 1995; Federici e Bauer, 1998, Martins *et al.*, 2006; Naimov *et al.*, 2001; Zhong *et al.* 2000), Cry1Ia para *L. decemlineata* e *A. grandis*; (Naimov *et al.*, 2001; Tailor *et al.*, 1992; Ruiz de Escudero *et al.*, 2006; Martins *et al.*, 2008), Cry3A para *C. scripta* e *Hypothenemus hampei* (James *et al.*, 1999, López-Pazos *et al.*, 2009), Cry14Aa para *Diabrotica* (Payne e Narva, 1994), Cry22Aa para *A. grandis* (Isaac *et al.*, 2001), Cry22Ab para *Diabrotica* e *L. decemlineata* (Mettus e Baum, 2000), Cry55Aa para *Phyllotreta spp.* (Guo *et al.*, 2008b) e Cyt2, mostrou ser tóxico para *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) (Weathersbee III *et al.*, 2006).

Este é um resultado promissor, portanto estas estirpes deverão ser mais estudadas, para que se conheçam suas proteínas e respectivos genes codificadores. Uma vez

conhecidos os genes, estes poderão ser engenheirados para inserção em cultivares de algodão numa tentativa de combate ao *A. grandis*, que é um inseto endofítico e de difícil combate por métodos convencionais.

CAPÍTULO III

"Nem tudo que se enfrenta pode ser modificado, mas nada pode ser modificado até que seja enfrentado". (Albert Einstein)

Fosfatases alcalinas ligadas à membrana de células intestinais por uma âncora de GPI (ALP-GPI) são prováveis receptores para a proteína Cry1b de *Bacillus thuringiensis* em *Anthonomus grandis*

1 – Introdução

As proteínas cristais (Cry), na forma de protoxinas, de *B. thuringiensis* são solubilizadas em pH alcalino no lúmen do intestino médio das larvas de insetos e convertidas em toxinas ativas por ação de proteases. A toxina ativa passa pela membrana peritrófica e se liga a receptores específicos localizados na borda escovada da membrana das células colunares do epitélio do intestino médio (BBMV) e, eventualmente, leva à morte celular. Como última consequência, as larvas param de se alimentar e morrem por inanição ou septicemia (Knowles, 1994; Schnepf *et al.*, 1998; Sauka *et al.*, 2007). Os eventos que ocorrem após a ligação ao receptor ainda não estão claros, embora tenha sido proposto que a permeabilização da membrana e a formação de poros, são induzidos pela inserção da toxina na membrana (Rodrigo-Simón *et al.*, 2008; Bravo *et al.*, 2007; Pigott e Ellar, 2007; Schnepf *et al.*, 1998).

Em um dos modelos propostos para o modo de ação de toxinas Cry1A, receptores do tipo caderina (CDR) e aminopeptidase N (APN) ou fosfatase alcalina (ALP) ancoradas a glicosil fosfatidil-inositol (GPI) têm um papel central (Bravo *et al.*, 2004, Pigott e Ellar, 2007). Foi proposto que a toxina Cry1A se liga primeiramente a uma proteína do tipo caderina e, após sofrer uma modificação proteolítica, um oligômero é formado. Este, se liga a APN ou ALP e se insere na membrana das células colunares (Rodrigo-Simón *et al.*, 2008). Um segundo modelo foi proposto em 2006, no qual a ligação da toxina ao receptor do tipo caderina seria suficiente para desencadear a morte celular, e que a ligação a APN ou ALP seria irrelevante nesse contexto, com a formação de poro como efeito secundário

desencadeado após a ligação da toxina a caderina (Zhang *et al.*, 2006, Zhang *et al.* 2005, Bravo *et al.*, 2004; Gill, 1995 a, b).

B. thuringiensis é utilizado mundialmente como biopesticida para controlar vários lepidópteros, coleópteros, e dípteros (Schnepf *et al.*, 1998). As toxinas mais conhecidas descritas como tóxicas para insetos da ordem Coleoptera são as das classes Cry3 e Cry8 (Bravo *et al.*, 1998; Abad *et al.*, 2001), mas outras toxinas como as pertencentes às classes Cry1, Cry22, Cry34 e Cry35 também têm sido descritas como tóxicas para insetos coleópteros (Baum *et al.*, 2004; Baum e Light Mettus, 2000, Tailor *et al.*, 1992).

O bicudo do algodoeiro, *A. grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae), é a principal praga do algodão nas Américas (Busoli *et al.*, 1994, Gallo *et al.*, 2002). A fim de reduzir danos e perdas de produção, esta praga tem sido controlada principalmente pela utilização de agentes químicos. Contudo, embora este tipo de controle tenha alcançado níveis eficientes de controle deste inseto (Martin *et al.*, 1987; Wolfenberger *et al.*, 1997), esses produtos oneram a produção e podem ter impactos ambientais negativos. Outros métodos de controle utilizados são o uso de feromônios (Gallo *et al.*, 2002), utilização de variedades precoces, catação e destruição de botões florais infestados (Silvie *et al.*, 2001), controle biológico (Pallini *et al.*, 2006) e manejo integrado de pragas (Luttrell *et al.*, 1994). Além disso, existe a possibilidade de produção de algodão transgênico contendo um ou mais genes *cry*, capazes de tornar a planta resistente ao ataque de insetos. Por outro lado, para manter a eficácia e evitar a resistência das espécies-alvo para as culturas transgênicas (plantas Bt), é interessante conhecer a identidade dos receptores de proteínas Cry e entender os mecanismos pelos quais ocorre às interações de toxinas Cry com estes receptores. Até agora nenhum receptor para proteína Cry com atividade para *A. grandis* foi identificado.

No capítulo anterior, foi mostrado que a estirpe S601 de *B. thuringiensis* (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - Monnerat *et al.*, 2001) apresentou alta toxicidade para *A. grandis* e, nesta estirpe foi identificada a presença do gene *cry1B*. Neste capítulo, será mostrada a clonagem do gene *cry1B* da estirpe S601, bem como a análise da atividade da proteína codificada por este gene para *A. grandis* e a detecção de um possível receptor presente em células do intestino médio desta espécie.

2 – Materiais e Métodos

2.1 – Clonagem e seqüenciamento do gene *cry1Ba*

As técnicas moleculares empregadas neste trabalho foram realizadas como descrito em Sambrook *et al.* (2001). Todos os oligonucleotídeos utilizados neste trabalho foram sintetizados pela Invitrogen. O gene *cry1Ba* da estirpe S601 de *B. thuringiensis* (Coleção de *Bacillus spp.* da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia) foi amplificado por PCR utilizando os oligonucleotídeos Cry1BF (5'-**ggatcc**ATGacttcaaatagg-3') e Cry1BR (5'-**ggatcc**cctattcttccatgagaga-3'), que foram desenhados a partir da sequência do gene *cry1Ba* já publicada (número de acesso no Genebank = X06711) (Brizzard e Whiteley, 1988). Sítios de restrição para a enzima *Bam*HI foram adicionados à sequência (letras em negrito). O programa de PCR utilizado para a amplificação foi de 94 °C/5min, 3 ciclos de 95 °C/1 min, 49 °C/1 min e 30s, 72 °C/1min e 30 s, e 27 ciclos de 95 °C/1 min, 52 °C/1 min e 30 s, 72 °C/1 min e 30 s, bem como uma extensão final de 72 °C/7 min. O fragmento amplificado foi clonado no vetor pGEM-T easy[®] (Promega), de acordo com as instruções do fabricante, e três clones positivos foram seqüenciados (MEGA BACE 1000[®], GE Helthcare Bioscience), seguindo as instruções do fabricante. As sequências de três clones foram analisadas usando os programas “ORF finder” e BLAST (Altschul *et al.*, 1990) disponível no site do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

2.2 – Clonagem do gene *cry1Ba6* em vetor de expressão para *B. thuringiensis*

O plasmídeo contendo o gene *cry1Ba6* (pGEMCry1Ba6) foi digerido com a enzima *Bam*HI, e o fragmento de 3.687 pb foi separado por eletroforese em gel de agarose a 0,8% e eluído do gel (Sephaglass[™] Bandprep Kit, Pharmacia), de acordo com protocolo fornecido pelo fabricante. O fragmento purificado foi clonado no vetor pSVP27A (Crickmore e Ellar, 1992; Crickmore *et al.*, 1990) gentilmente cedido pelo Dr David Ellar (Cambridge University), previamente digerido com a enzima *Bam*HI, levando ao plasmídeo recombinante pSVPCry1Ba6. Um micrograma de DNA do plasmídeo pSVPCry1Ba6 foi usado para transformar a estirpe acristalífera de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*

IPS78/11 (Ward e Ellar, 1983 - gentilmente cedido pelo Dr David Ellar, Cambridge University), por eletroporação (1,8 kV, 400 Ω e 25 μ F). A presença do gene *cry1Ba6* na estirpe de Bt recombinante foi verificada por PCR usando os oligonucleotídeos anteriormente descritos.

2.3 – Análise da expressão da proteína recombinante Cry1Ba6

A estirpe recombinante BtCry1Ba6 contendo o gene *cry1Ba6* foi crescida por 72 h em meio de esporulação (Lereclus *et al.*, 1995) suplementado com cloranfenicol (10 μ g.mL⁻¹) a 30 °C e 200 rpm até completa esporulação. A mistura esporo/cristal foi lavada três vezes com PBS (NaCl 150 mmol.L⁻¹, NaH₂PO₄ 2,8 mmol.L⁻¹, Na₂HPO₄.7H₂O 4 mmol.L⁻¹, pH 7,2) contendo EDTA 1 mmol.L⁻¹, PMSF 0,1 mmol.L⁻¹, pepstatina 1 μ g.L⁻¹ e leupeptina 5 μ g.mL⁻¹.

Os cristais foram purificados por gradiente de sacarose de acordo com o protocolo descrito por Chang *et al.* (1993), com modificações. Os cristais foram recuperados utilizando uma solução de Triton X100 a 1% e PMSF 100 mmol.L⁻¹ e solubilizados com uma solução alcalina contendo tampão carbonato de sódio 50 mmol.L⁻¹ pH 10,5 com 0,2% (v/v) de β -mercaptoetanol por 1 h a 37 °C com agitação constante de 37 rpm (New Brunswick modelo Innova 2100). A amostra foi centrifugada por 5 min a 12.000 x g e as proteínas solúveis foram quantificadas usando-se o reagente de Bradford (Bio Rad) (Bradford, 1976), seguindo as instruções do fabricante. O pH da solução contendo a proteína solubilizada foi ajustado para pH 9,0 adicionando-se igual volume de Tris-HCl, pH 8,0 mol.L⁻¹ e a protoxina ativada com tripsina (1:50 m/m) por 2 h a 37 °C. As proteínas ativadas foram recuperadas por centrifugação (12.000 x g por 10 min) e quantificadas como descrito acima. A massa molecular e a integridade das proteínas foram analisadas por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12%, conforme Laemmli (1970). O gel foi corado e fixado em solução de metanol 40%, ácido acético 10% e Azul de commasie a 0,1% por cerca de 16 h, sob leve agitação e descorado em solução de metanol 40% e ácido acético 10% por 3h, sob leve agitação.

2.4 – Análise ultraestrutural dos cristais da proteína Cry1Ba6

Cem microlitros dos cristais purificados foram espalhados em uma base de metal, e secos à temperatura ambiente. O material foi então, coberto com ouro por 180s usando um aspersor “sputter coater” Emitech K550 (Ashford, Kent) e visualizados em microscópio de varredura (DSM 962; Zeiss, Thornwood, NY).

Para visualização dos cristais da proteína Cry1Ba6 dentro da estirpe recombinante, a mistura esporo/cristal foi processada para microscopia eletrônica de transmissão (MET). A estirpe recombinante BtCry1Ba6 foi crescida por 36 h em meio de esporulação (Lereclus *et al.*, 1995) suplementado com cloranfenicol ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$) a 30°C e 200 rpm. Em seguida, 100 μL da cultura foram centrifugados a $2.000 \times g$ por 10 min, o sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado em tampão fixador (2,0% de glutaraldeído, 2,0% de paraformaldeído, 0,1 mol/L de tampão cacodilato e 5,0% de sacarose). As células foram fixadas por 24 h e depois infiltradas e emblocadas, segundo protocolo descrito por Bozzola & Russel, (1992). Depois de emblocadas, as amostras foram fatiadas (80 nm) em ultramicrótomo automático Leica ultracut UCT e estes foram montados em tela de níquel de 200 mesh. As amostras foram visualizadas em microscópio eletrônico de transmissão Jeol 1011 e as imagens obtidas pelo programa GATAN Bio Scan câmera, modelo 792.

2.5 – Bioensaio com a proteína recombinante Cry1Ba6

O bioensaio com larvas neonatas de *A. grandis* foi realizado incorporando-se a proteína recombinante em 5 mL de dieta, como descrito por Martins *et al.* (2007) e, em seguida, a dieta foi vertida em placa de Petri (15 mm x 20 mm). Após solidificação, cinco larvas foram colocadas em cinco furos feitos na dieta. Foram testadas cinco doses ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e mais um controle. O bioensaio foi mantido em câmara de incubação com fotofase de 14:10h de claro/escuro e a uma temperatura de 27°C . Para comparação dos resultados obtidos, foram feitos ensaios com a estirpe S1122 de *B. thuringiensis tenebrionis* (Btt), que é a estirpe padrão para insetos da ordem Coleoptera. Uma semana após o ensaio, fez-se a leitura determinou-se a CL_{50} , pela análise de Probits (Finney, 1971). Os bioensaios foram repetidos três vezes e os

valores de CL₅₀ foram comparados por ANOVA usando o programa Sigma Stat (Kuo *et al.*, 1992).

2.6 – Eletroforese Bidimensional (2D-E)

Para a eletroforese bidimensional, géis de gradiente imobilizado de pH, Immobiline™ Dry strip 18cm foram utilizados, na faixa de pH 3-10 linear. A amostra purificada por gradiente de sacarose, liofilizada (correspondente a 20 µL) foi ressuspendida em 350 µL de tampão 2DE, composto de DTT 58 nmol.L⁻¹, Triton X-100 2,5% (m/v), uréia 7 mol.L⁻¹, tiouréia 2 mol.L⁻¹ e isopropanol 10%. A amostra foi aplicada por reidratação *in gel* durante 6 h a 20 °C, a corrente constante de 50 µA/strip com um total de 33680 Vh, usando as seguintes etapas: *step* 6h – 60V, *step* 1h – 1000V, *step* 4h – 8000V. Após a focalização, os *strips* foram reduzidos em solução de equilíbrio, que continha Tris 50 mmol.L⁻¹ pH 8,0, uréia 6 mol/L, glicerol 30% (v/v), SDS 2% (m/v), adicionado com 125 mmol.L⁻¹ de DTT, durante 40 min, e posteriormente alquilados na mesma solução de equilíbrio adicionada com acrilamida 300 mmol.L⁻¹ (Mineki *et al.*, 2002; Yan *et al.*, 1999; Sanchez *et al.*, 1997).

O *strip* 3 – 10 equilibrado foi transferido para gel de SDS-PAGE 12% (20 x 20 cm). A segunda dimensão foi feita usando a cuba Protean® II xii Cell (Bio-Rad), a corrente constante de 25 mA/gel. O gel foi fixado e corado com nitrato de prata.

2.7 – Espectrometria de Massas

Os *spots* manualmente excisados a partir dos géis bidimensionais foram descorados com solução de ferrocianeto de potássio 0,5% (m/v), tiosulfato de sódio 0,8% (m/v), e posteriormente submetidos a lavagens sucessivas de acetonitrila-carbonato de sódio. Dois µL de solução gelada de tripsina modificada (Promega™) (12,5 ng.µL⁻¹) em tampão (50 mmol.L⁻¹ NH₄HCO₃, CaCl₂ 5 mmol.L⁻¹), foram utilizados para a digestão triptica dos *spots*. Um microlitro da amostra foi disposto na placa de amostras anchorChip® (Bruker), misturado com 1 µL da solução da matriz HCCA, contendo 20 µg.µL⁻¹ em acetonitrila 70% (m/v) e ácido trifluoroacético 0,1% (m/v).

MALDI-TOF MS e MS/MS dos peptídeos trípticos e fragmentos de íons foram gerados no equipamento Autoflex II TOF/TOF (Bruker Daltonics). As massas dos espectros foram calibradas externamente com o kit Pep Mix (Promega™). Tanto os peptídeos trípticos quanto os fragmentos de íons obtidos a partir dos MALDI-TOF MS e MS/MS respectivamente, foram usados para a busca das proteínas candidatas na base de dados não redundante NCBI usando o software MASCOT (Matrix Science), seguindo os seguintes parâmetros de busca: categoria da taxonomia Bactéria (Eubactéria), erro máximo permitido na massa do peptídeo 0,1 Da, oxidação da metionina e consideração de máximo uma perda na clivagem da tripsina.

2.8 – Preparação de BBMVs de *A. grandis*

As BBMVs foram obtidas a partir de intestinos dissecados de larvas de *A. grandis* de quarto estágio de desenvolvimento, por precipitação diferencial usando MgCl₂, como reportado por Wolfesberger *et al.* (1987).

Um grama de intestino médio de *A. grandis* foi homogeneizado em 5 mL de tampão de homogeneização (200 mmol.L⁻¹ de manitol, 10 mmol.L⁻¹ de ácido ascórbico, 5 mmol.L⁻¹ de EDTA, 0,2 mmol.L⁻¹ de leupeptina, 0,03% (m/v) PMSF, 2 mmol.L⁻¹ de DTT, 10 mmol.L⁻¹ de MES – pH 7,4 ajustado com Tris-HCl 1,0 mol.L⁻¹ pH 8,0) durante 10s em aparelho homogeneizador blender-polytron a ³/₄ da velocidade máxima. Foi adicionado aos intestinos, um mL de MgCl₂ a 24 mmol.L⁻¹ frio e a amostra incubada no gelo por 10 min. Em seguida, foram centrifugados a 6.000 x g por 10 min a 4 °C e o sobrenadante transferido para outro tubo e centrifugado novamente a 30.000 x g por 30 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado em um mL de tampão de estoque (200 mmol.L⁻¹ de manitol, 1 mmol.L⁻¹ de DTT e 1 mmol.L⁻¹ de Hepes-tris – pH 7,4).

As BBMVs purificadas foram quantificadas pelo método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951), alíquotadas e armazenadas a -80 °C.

2.9 – Biotinilação das proteínas

A proteína recombinante Cry1Ba6 solubilizada foi biotiniada com auxílio do kit ECL Protein Biotinylation System (GE Helthcare) de acordo com as recomendações do fabricante. Após a biotinilação, foi feito um “western-blotting” para confirmação da biotinilação.

Após biotinilação a proteína marcada foi ativada com tripsina (1:50).

Primeiramente, procedeu-se uma eletroforese em gel de SDS-PAGE a 12% com 10 µg das amostras biotiniadas da proteína Cry1Ba6. As proteínas foram, então, transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Hybond ECL-nitrocellulose membrane – GE Helthcare), usando uma corrente constante de 350 mA em sistema submarino (Hoefer) por 40 min em tampão de transferência [25 mmol.L⁻¹ de Tris, 192 mmol.L⁻¹ de Glicina e metanol 20% (v/v)]. A membrana foi incubada por 16 h com PBS 1X e a visualização se deu por incubação da membrana com streptavidina-peroxidase conjugada (1:4000 – GE Helthcare) por 1 h, seguida de detecção usando o substrato SuperSignal[®] chemiluminescence (Pierce) segundo as recomendações do fabricante.

2.10 – Ensaio de ligação

A ligação da toxina Cry1Ba6 biotiniada e ativada (10 nmol.L⁻¹) com 10 µg de BBMV's de *A. grandis* foi realizada em 100 µL de tampão de ligação [PBS (pH 7.6), 0.1% (m/v) BSA, 0.1% (v/v) Tween 20] por 1 h de incubação a 37 °C. A toxina não ligada foi removida por centrifugação (10 min a 14000 x g) e as BBMV's foram lavadas três vezes no tampão de ligação e ressuspendidas em 15 µL de PBS 1X e 5 µL de tampão de amostra Laemmli 4X [0,125 mol.L⁻¹ t (pH 6.8), 4% (m/v) SDS, 20% (v/v) glicerol, 10% (v/v) 2-mercaptoetanol, 0,01% (m/v) Azul de Bromofenol]. As amostras foram fervidas por 3 min e separadas em SDS-PAGE a 9%.

As proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Hybond ECL-nitrocellulose membrane – GE Helthcare), a uma corrente constante de 350 mA em sistema submarino (Hoefer) por 40 min em tampão de transferência [25 mmol.L⁻¹ Tris, 192 mmol.L⁻¹ Glicina e metanol 20% (v/v)]. A ligação das toxinas biotiniadas com as BBMV's foi visualizada após incubação com streptavidina-peroxidase conjugada (1:4000 – GE

Helthcare) por 1h, seguida de incubação com SuperSignal chemiluminescence substrate (Pierce) segundo as recomendações do fabricante.

Para o ensaio de competição, 10 nmol.L⁻¹ da toxina marcada com biotina e 1000 nmol.L⁻¹ da toxina não marcada foram incubadas com 10µg de BBMV de *A. grandis* em 100 µL de tampão de ligação e as amostras processadas como descrito..

2.11 – Purificação de proteínas ancoradas a GPI que se ligam a Cry1Ba6

Trezentos microgramas de BBMVs de *A. grandis* foram ressuspensas em 500 µl de PBS2 [NaCl 137 mmol.L⁻¹, KCl 2,7 mmol.L⁻¹, Na₂HPO₄ 10 mmol.L⁻¹ (pH 7.2)]. Três unidades de PIPLC (fosfolipase-C) de *B. cereus* (Sigma) foram adicionadas à suspensão de BBMVs e incubadas por 90 min a 30 °C, como descrito por Fernandez *et al.* (2006). As membranas foram recuperadas por centrifugação (11.000 x *g* por 20 min), e o sobrenadante foi analisado para presença de proteínas ancoradas a GPI, que foram solubilizadas pela ação da PI-PLC, por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida a 12%. A matriz de agarose-estreptavidina conjugada (200 µl; Sigma – Aldrich) foi incubada com 7 µg da toxina Cry1Ba6 biotilada por 16h a 4°C. Após a incubação, a matriz foi lavada com 10 volumes de PBS2 a fim de se remover as proteínas não ligadas. Quarenta e dois microgramas de proteínas de BBMVs, tratadas com PIPLC foram incubadas com 200 µL da matriz de agarose marcada com a proteína Cry1Ba6 biotilada e ativada, por 2 h a 4 °C. Após incubação, a matriz foi lavada quatro vezes com PBS2 pH 7,2. As proteínas ligadas à membrana foram eluídas usando 200 µL de PBS2, pH 9,5. O pH das amostras eluídas foi ajustado para 7,2 e as mesmas foram estocadas a 4 °C em solução de PMSF 1mmol.L⁻¹ (Fernandez *et al.*, 2006).

2.12 – Detecção de atividade específica de ALP (fosfatase alcalina) e APN (aminopeptidase)

Atividades específicas de ALP e APN foram mensuradas (nas BBMV intactas, no sobrenadante de BBMVs tratadas co PI-PLC e no produto da cromatografia de afinidade) de acordo com protocolo descrito por Fernandez *et al.* (2006), usando *p*-nitrofenilfosfato e

leucina-*p*-nitroanilida (Sigma–Aldrich) como substrato, respectivamente. Cinco microgramas de BBMV's foram misturadas com tampão para ALP [MgCl_2 0,5 mmol.L^{-1} , Tris/HCl 100 mmol.L^{-1} (pH 9.5)] contendo 1,25 mmol.L^{-1} de *p*-nitrofenil fosfato ou tampão para APN [Tris/HCl 0,2 mol.L^{-1} (pH 8), NaCl 0,25 mol.L^{-1}] contendo 1 mmol.L^{-1} de *p*-nitroleucina anilida. A atividade enzimática foi monitorada a 405 nm por 3 min a 25 °C. Uma unidade de ALP foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para produzir 1 nmol.L^{-1} de *p*-nitrofenol por min em função da quantidade de proteína ($\text{nmol/L.mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}/\mu\text{g}$) e uma unidade APN foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para produzir 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de *p*-nitroanilina por min em função da quantidade de proteína ($\mu\text{mol/L.mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}/\mu\text{g}$)

2.13 – Análise ultraestrutural de intestinos de *A. grandis* incubados com a proteína recombinante Cry1Ba

Larvas de *A. grandis* de quarto estágio de desenvolvimento foram fixadas em uma solução contendo glutaraldeído 2,5% (v/v), CaCl_2 5 mmol.L^{-1} e sacarose 5% (m/v) em tampão cacodilato de sódio 0,1% (m/v) pH 7,3 a 4 °C por 16 h. Após a fixação, as larvas foram lavadas quatro vezes, por 20 min, com PBS 1X, em seguida foram desidratadas com acetona em série crescente de concentrações (30-100%), por 20 min em cada concentração, e embebidas em resina LRGold (Thorpe, 1999; Fournier e Escaig-Haye, 1999). O processo de infiltração foi feito lentamente, a troca da resina foi feita a cada 16 h [2 acetona:1 resina, 1 acetona:1 resina, 1 acetona:2 resina e resina pura (2X)], uma vez que estas larvas possuem uma espessa camada de tecido adiposo, o que dificulta a infiltração da resina. Após a última troca de resina, os espécimes foram transferidos para cápsulas de gelatina e colocados em câmara de polimerização (4 °C e luz UV) por 72 h. Cortes de 80 nm foram feitos em ultramicrótomo automático Leica ultracut UCT e montados em tela de níquel de 200 mesh. Os cortes ultrafinos foram bloqueados com BSA 1% (m/v) em PBS por 1h a 25 °C e incubadas por 1h a 25 °C com solução contendo 30 nmol.L^{-1} da toxina Cry1Ba6 biotinizada e ativada. Os cortes ultrafinos foram lavados 3X em PBS por 30s, para eliminar as toxinas não marcadas e então, foram incubadas por 1h a 25 °C com Nanogold® estreptavidina conjugada ($\varnothing = 1,5 \text{ nm}$ / Invitrogen) (1:100) em PBS. Os cortes ultrafinos

foram lavados 3X com mQH₂O por 30s e contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo. Os cortes ultrafinos foram visualizados em microscópio eletrônico de transmissão Jeol 1011 e as imagens foram obtidas através do programa GATAN Bio Scan câmera, modelo 792.

Para verificar se a ligação foi realmente específica, foi feito um ensaio de competição homóloga, usando toxina Cry1Ba6 não marcada. Os cortes ultrafinos foram bloqueados com BSA 1% (m/v) em PBS por 1h a 25 °C e incubados por 1h a 25 °C com solução contendo 100 nmol.L⁻¹ ou 1000 nmol.L⁻¹ da toxina Cry1Ba6 não marcada. Em seguida, foram lavados 3X em PBS por 30s e incubados com 30 nmol.L⁻¹ da toxina Cry1Ba6 biotinizada e ativada por 1h a 25 °C. Os cortes ultrafinos foram lavados 3X em PBS por 30s, para eliminar as toxinas não marcadas e então, foram incubadas por 1h a 25 °C com Nanogold®-estreptavidina conjugada (Ø = 1,5 nm / Invitrogen) (1:100) em PBS. Os cortes ultrafinos foram lavados 3X com mQH₂O por 30s e contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo. Os cortes ultrafinos foram visualizados em microscópio eletrônico de transmissão Jeol 1011 e as imagens foram obtidas através do programa GATAN Bio Scan câmera, modelo 792.

3 – Resultados

3.1 – Clonagem e seqüenciamento do gene *cry1B* da estirpe S601

O fragmento de 3,6 kb amplificado por PCR da estirpe *B. thuringiensis* S601 (Fig. 3.1) foi clonado no vetor pGem T-easy[®] (promega) originando o plasmídeo pGEMCry1Ba6 (Fig. 3.2), que foi seqüenciado. A análise de restrição com a enzima *Bam*HI e a confirmação da inserção por amplificação (PCR) com os oligonucleotídeos específicos para o gene *cry1B*, já descritos anteriormente, podem ser observadas nas fig. 3.1 e 3.2. A análise da composição nucleotídica deste gene revelou uma ORF de 3.687 pb que potencialmente codifica uma proteína de 1.228 aminoácidos (Fig 3.3)

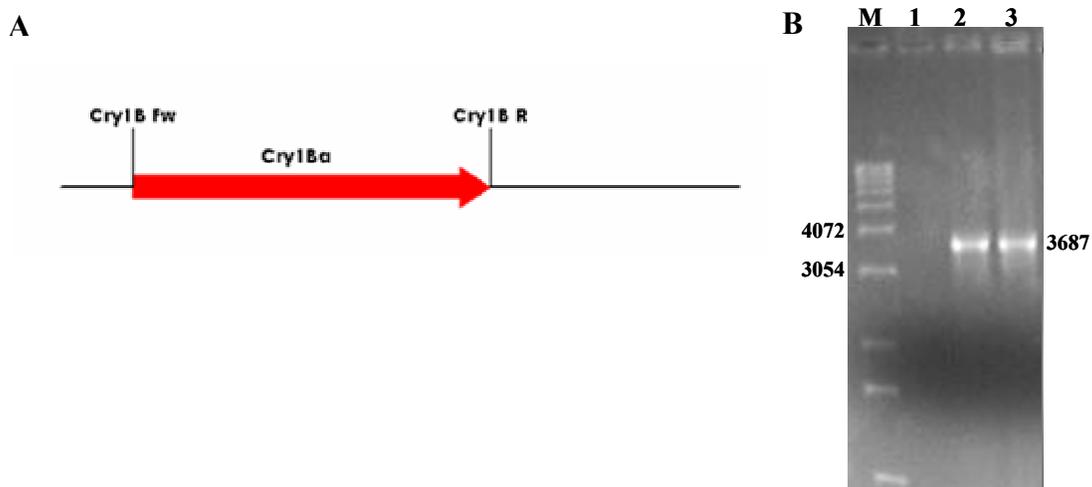


Figura 3.1: Amplificação por PCR do gene *cry1B* da estirpe S601 de *B. thuringiensis*. A: Esquema ilustrativo mostrando os oligonucleotídeos *cry1B* Fw e *cry1B* R no gene de interesse. B: Eletroforese em gel de agarose (1,0%) mostrando produtos de amplificação por PCR, com os oligonucleotídeos descritos em A, para o gene *cry1B* – M: Marcador 1Kb DNA ladder (Invitrogen), 1: controle negativo, 2: controle positivo (DNA de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*) e 3: DNA de *B. thuringiensis* estirpe S601.

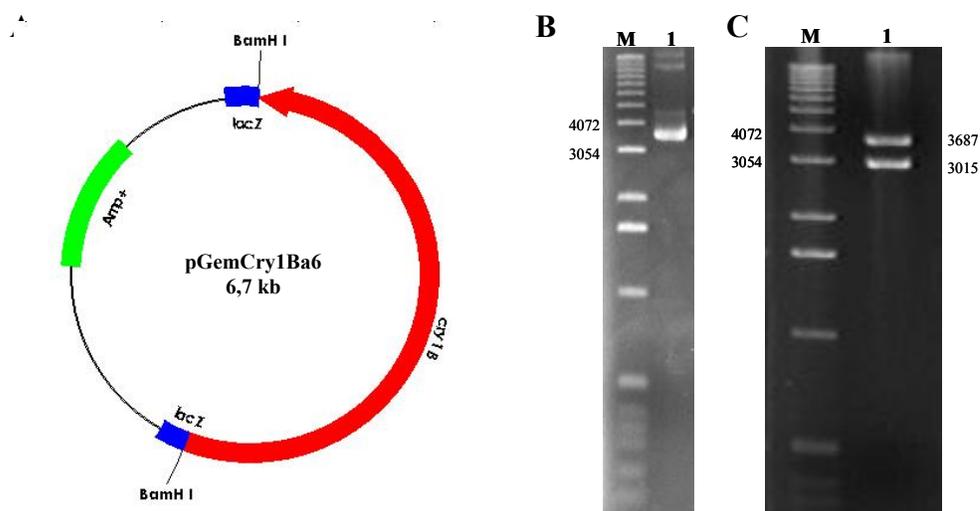


Figura 3.2: Análise do gene *cry1B* clonado da estirpe de *B. thuringiensis* S601. A: Esquema ilustrativo mostrando o plasmídeo pGemCry1Ba6. B: Eletroforese em gel de agarose (1,0%) do produto de amplificação por PCR para o gene *cry1B* usando DNA do clone pGemCry1Ba6 como molde e os oligonucleotídeos *cry1B* Fw e *cry1B* R (poço 1) – M: Marcador 1Kb DNA ladder (Invitrogen). C: Eletroforese em gel de agarose (1,0%) mostrando os fragmentos resultantes da digestão do DNA do plasmídeo pGem1B601 com a enzima *Bam*HI (poço 1).

Três clones positivos contendo o plasmídeo pGemCry1Ba6 foram sequenciado inicialmente com os oligonucleotídeos universal e reverso e, posteriormente, com oligonucleotídeos internos (mostrados em rosa na Fig. 3.3). A análise da sequência obtida dos três clones revelou a presença de uma ORF de 3.687pb codificando 1.228 aminoácidos (Fig. 3.3). A análise por BLAST da sequência obtida, comparada à sequência padrão do gene *cry1Ba* depositada no Genbank acesso n.º CAA29898, Brizzard e Whiteley (1988), revelou que a ORF contida no pGemCry1Ba6 possui 11 nucleotídeos diferentes, que resulta na mudança de oito aminoácidos, D253G, D260G, V566A, D609N, F760S, R798E (mutação em dois nucleotídeos que codificam o mesmo aminoácido ag2392-3ga), R1077S e I3569M (Fig. 3.3). As outras duas mutações, g1055a e t2047c, não implicaram em mudança de aminoácidos. A análise por BLAST revelou também que o gene em questão possui 99% de identidade com o gene *cry1Ba* descrito por Brizzard e Whiteley (1988). O gene *cry1B* da estirpe S601 foi depositado no GenBank e recebeu o número de acesso EF102874 e foi denominada *cry1Ba6*, estando listado no site: http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/.

ggatccATGacttcaaatagg

1 atgacttcaaataggaaaaatgagaatgaaattataaatgctgtatcgaatcattccgcacaaatggatctattaccagatgctcgtattgaggatagcttgtgtatagccgaggggaacaatatc
M T S N R K N E N E I I N A V S N H S A Q M D L L P D A R I E D S L C I A E G N N I

127 gatccatttggtagcgcacatcaacagtcctcaaacgggtattaacatagctggtagaataactagggcgtattgggcgtaccggttggctggacaactagctagttttatagtttctgttgggaatta
D P F V S A S T V Q T G I N I A G R I L G V L G V P F A G Q L A S F Y S F L V G E L

253 tggccccgcggcagagatcagtgaggaaatcttcctagaacatgctcgaacaacttataaatcaacaataacagaaaatgcttaggaatacggctcttgcctcgcattacaaggttaggagattccttc
W P R G R D Q W E I F L E H V E Q L I N Q Q I T E N A R N T A L A R L Q G L G D S F

379 agagcctatcaacagtcacttgaagattggctagaaaaccgtgatgcaagaacgagaagtgcttttatacccaatatagctttagaacttgattttcttaagcgcgcttttgcgca
R A Y Q Q S L E D W L E N R D D A R T R S V L Y T Q Y I A L E L D F L N A M P L F A

505 attagaacaaccaagagattccattattgatggatattgctcaagctgcaaatttacacctattattattgagagatgcctctcttttggtagtgaattgggcttacatcgcaggaattcaacg
I R N Q E V P L L M V Y A Q A A N L H L L L L R D A S L F G S E F G L T S Q E I Q R

631 tattatgagcgcgaagtgaacgaacgagagattatccgactattgcgtagaatggataatacaggtctaaatagcttgagagggacaaatgccgaagttgggtacggtataatcaaattccgct
Y Y E R Q V E R T R D Y S D Y C V E W Y N T G L N S L R G T N A A S W V R Y N Q F R

757 agaggtcctaacgcttaggagtaggctcctagtgccactattcccaagctatgacactcgcacttccaataaatacagagtgctcagttaacaagagaagttatacagacgcaattggagcaaca
R G L T L G V L G L V A L F P S Y D T R T Y P I N T S A Q L T R E V Y T D A I G A T
D D

883 ggggtaaatatggcaagtagaattgggtataataataatgcaccttcgcttctctgcatagaggctcgggctatccgaagcccgcatctacttgattttctagaacaacttacaatttttagcgct
G V N M A S M N W Y N N N A P S F S A I E A A A I R S P H L L D F L E Q L T I F S A

1009 tcatcacgatggagtaataactaggcatatgacttattggcgggggacacgattcaatctcggccaataggaggcggattaatacctcaacgcatggggctaccaatacttctattaatcctgta
S S R W S N T R H M T Y W R G H T I Q S R P I G G G L N T S T H G A T N T S I N P V

1135 acattacggttcgcatctcgagacgtttataggactgaatcatatgcaggagtgcttctatggggaatttaccttgaacctattcatgggtgctcctactggttaggttaattttacgaaccctcag
T L R F A S R D V Y R T E S Y A G V L L W G I Y L E P I H G V P T V R F N F T N P Q

1261 aatatttctgatagaggtaccgctaactatagtcacacttatgagtcacctgggcttcaattaaaagattcagaaactgaattaccaccagaacaacagaacgaccaaattatgaatcttacag
N I S D R G T A N Y S Q P Y E S P G L Q L K D S E T E L P P E T T E R P N Y E S Y S

1387 cacaggttatctcatataggtataattttacaatccagggtgaatgtaccggtatattcttggacgcatcgtagtcgacatcgtacgaatacagattggaccaaataagaatcacccaaatcccaatg
H R L S H I G I I L Q S R V N V P V Y S W T H R S A D R T N T I G P N R I T Q I P M

1513 gtaaaagcatccgaacttctcaaggtaccactgttggtagaggaccaggatttactgggtggggatattcttcgaagaacgaataactgggtgatttggaccgataagagtaactgttaacggacca
V K A S E L P Q G T T V V R G P G F T G G D I L R R T N T G G F G P I R V T V N G P
t

1639 ttaacacaaagatctgataggtatccgctatgcttcaactgtagattttgatttcttgcacacgtggaggtactactgtaataattttagatttctacgtacaatgaacagtgaggagcga
L T Q R Y R I G F R Y A S T V D F D F F A S R G G T T V N N F R F L R T M N S G D E
V g

1765 ctaaataacggaatgttggtagacgtgcttttactacaccttttacttttacacaaatcaaataataattcgaacgtctattcaaggccttagtggaatggggaagtgtatatagataaaatt
L K Y G N F V R R A F T T P F T F T Q I Q N I I R T S I Q G L S G N G E V Y I D K I
D

1891 gaaattattccagttactgcaacctcgaagcagaatagatttagaaagagcgaagaggcggatgctctgcttactaatacgaatccaagaagattgaaaacagatgtgacagattatcat
E I I P V T A T F E A E Y D L E R A Q E A V N A L F T N T N P R R L K T D V T D Y H
t

2017 attgatcaagtatccaatttagtgcgctctatcggatgaattctgcttggatgaaaagagagaattacttgagaaagtgaatatgcaaacgactcagtgatgaagaaacttactccaagat
I D Q V S N L V A C L S D E F C L D E K R E L L E K V K Y A K R L S D E R N L L Q D

2143 ccaaactcacatccatcaataagcaaccagacttcatatctactaatgagcaatcgaatttcacatctatccatgaacaatctgaacatggatgggtggggaagtgagaaacattaccatccaggaa
P N F T S I N K Q P D F I S T N E Q S N F T S I H E Q S E H G W W G S E N I T I Q E

```

2269 ggaaatgacggtattctaaagagaattacgtcacactaccgggtacttttaatgagtggtatccgacgtatttatatcaaaaaataggggagtcggaattaaagcttatactcgctaccaattaaggaa
G N D V S K E N Y V T L P G T F N E C Y P T Y L Y Q K I G E S E L K A Y T R Y Q L E
2395 gggtatattgaagatagtcagatttagagatatattgattcgttataatgCGaaacatgaaacattggatgttccaggtaccgagtcctatggccgctttcagttgaaagcccaatcggaagg
G Y I E D S Q D L E I Y L I R Y N A K H E T L D V P G T E S L W P L S V E S P I G R
2521 tgcggagaaccgaatcgatgCGcaccacattttgaatggaatcctgatctagattgttctctgCagagatggagaaaaatgtgCGcatcattcccatcatttctctttggatattgatgttggatgc
C G E P N R C A P H F E W N P D L D C S C R D G E K C A H H S H H F S L D I D V G C
2647 acagacttgcgatgagaatctaggcgtgtgggtggtattcaagattaagacgcaggaaggtcatgcaagactagggaaatctggaatttattgaagagaaaccattattaggagaagcactgtctcgt
T D L H E N L G V W V V F K I K T Q E G H A R L G N L E F I E E K P L L G E A L S R
2773 gtgaagagggcagagaaaaaatggagagacaaactgtaaaaactacaattggaaacaaaacgagtatatacagaggcaaaagaagctgtggatgctttattcgtagattctcaatgatagatta
V K R A E K K W R D K R E K L Q L E T K R V Y T E A K E A V D A L F V D S Q Y D R L
2899 caagcggatacaaacatcggcatgattcatgCGgcagataaaacttgttcatcgaattcGagagggcgtatctttcagaattacctgttatcccaggtgtaagCGgaaatttttgaagaatttagaa
Q A D T N I G M I H A A D K L V H R I R E A Y L S E L P V I P G V N A E I F E E L E
2025 ggtcacattatcactgcaatctccttatacGatgCGgagaaatgctgtaaaaatgggtattttaataatggattaacatggtggaatgtaaagggcatgtagatgtacaacagagccatcatcgt
G H I I T A I S L Y D A R N V V K N G D F N N G L T C W N V K G H V D V Q Q S H H R
3151 tctgaccttggtatcccagaatgggaagcagaaggtgcacaagcagttcgcgtctgtccgggggtgtggctatatccttgagtgtcacagcgtacaaagaggggatatggagagggctgcgtaacgatc
S D L V I P E W E A E V S Q A V R V C P G C G Y I L S V T A Y K E G Y G E G C V T I
3277 catgaaatcgagaacaatacagacgaactaaaatttaaaaaccgtgaagaagaggaagtgatccaacggatacaggaacggtgtaatgattatactgcacaccaaggtacagctggatgCGcagat
H E I E N N T D E L K F K N R E E E E V Y P T D T G T C N D Y T A H Q G T A G C A D
3403 gcatgtaattcccgtaatgctggatgaggatgcatatgaagttgatactacagcatctgtaattacaaaccgacttatgagaagaaacgtatacagatgtaagaagagataatcattgtgaa
A C N S R N A G Y E D A Y E V D T T A S V N Y K P T Y E E E T Y T D V R R D N H C E
3529 tatgacagaggggatgtcaattatccaccagtagcagctgggttatgtgacaaaagaattagaatacttcccagaaacagatacagtatggattgagattggagaaacggaaggaaagtttattggta
Y D R G Y V N Y P P V P A G Y V T K E L E Y F P E T D T V W I E I G E T E G K F M V
gaggagtaccttcttATCctagg
3655 gatagcgtggaattactcctcatggaagaatag
D S V E L L L M E E *

```

Figura 3.3: Sequencia de nucleotídeos completa do gene *cry1Ba* clonado da estirpe S601 e sequência deduzida de aminoácidos da ORF. Em laranja está demarcada a sequência correspondente aos oligonucleotídeos *cry1B* Fw, e *cry1B* R que se anelam nas posições -6 a +15 e +3669 a +3693 respectivamente. Em vermelho estão marcados os nucleotídeos que diferem da sequência padrão do gene *cry1Ba*, depositada no Genbank (acesso n.º [CAA29898](#)), Brizzard e Whiteley (1988), em azul estão marcados os aminoácidos que diferem da sequência padrão da proteína Cry1Ba, em rosa estão marcados os oligonucleotídeos internos que foram usados para o seqüenciamento do gene *cry1Ba*. O asteriscos indicam o códon TAG, que corresponde ao códon de terminação do gene *cry1Ba*. A ORF deste gene é formada por 3.687 nucleotídeos, que correspondem a 1.128 aminoácidos.

Com o auxílio do programa CDART: Conserved Domain Architecture Retrieval Tool (Marchler-Bauer e Bryant, 2004), disponível no GenBank, foi possível prever os domínios conservados da proteína codificada pelo gene *cry1Ba*, comparadas à proteína Cry3A (1DLC), mostrando que a proteína Cry1Ba da estirpe S601 possui estrutura tridimensional semelhante à maioria das toxinas Cry (Fig. 3.4).

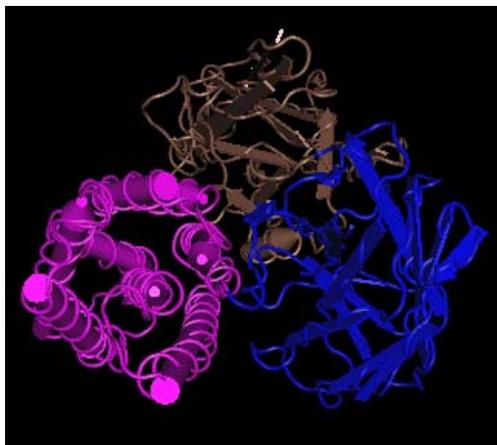


Figura 3.4: Predição da estrutura tridimensional da proteína Cry1Ba6 da estirpe S601 feita no programa CDART. Em rosa o domínio I formado por 7 α -hélices, em azul o domínio II, formado por folhas β -pregueadas e em marrom o domínio III, também formado por folhas β -pregueadas.

3.2 – Expressão de proteína recombinante Cry1Ba6 em *B. thuringiensis*

3.2.1 – Clonagem do gene *cry1Ba6* em vetor de expressão para *B. thuringiensis*

O gene *cry1Ba6*, clonado no plasmídeo pGemCry1Ba6, foi digerido com a enzima *Bam*HI e o fragmento de DNA correspondente ao gene, foi clonado no vetor pSVP27A previamente digerido com a mesma enzima, gerando o plasmídeo recombinante pSVP1B601 clonado em *E. coli* (Fig 3.5) este procedimento é realizado para se obter grandes quantidade de DNA, para subclonagem em Bt. O vetor pSVP1B601 foi transformado em Bt acristalífero por eletroporação.

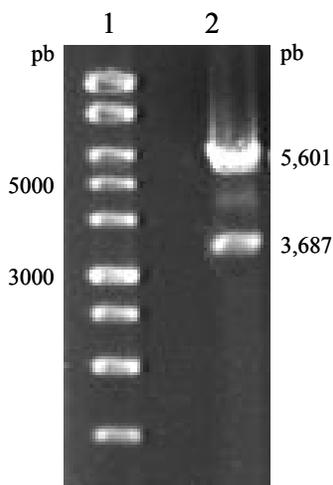


Figura 3.5: Análise do gene *cry1B* clonado em *B. thuringiensis*. Eletroforese em gel de agarose (1,0%) mostrando os fragmentos resultantes da digestão do DNA do plasmídeo pSVP1B601 com a enzima *Bam*HI – 1: Marcador 1Kb DNA ladder (Invitrogen), 2: pSVP1B601 digerido com *Bam*HI.

3.2.2 – Análise da expressão da proteína recombinante Cry1Ba6 expressa em Bt

A eletroforese em gel desnaturante de poliácridamida mostrou que a estirpe recombinante expressa um polipeptídeo de 140 kDa (Fig. 3.6) semelhante ao polipeptídeo expresso pela estirpe selvagem S601. Esta banda não foi visualizada na estirpe de Br Cry⁻.

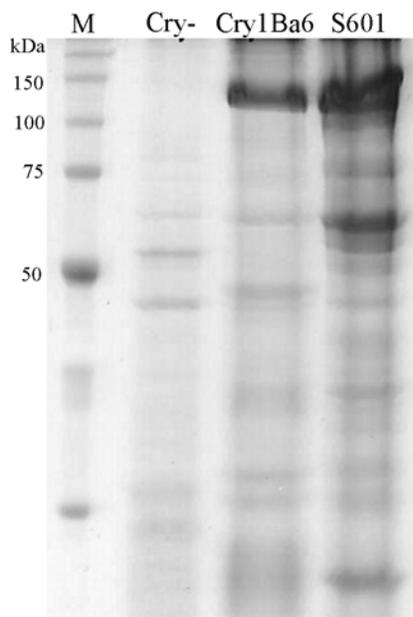


Figure 3.6: Análise da expressão de proteína pela estirpe recombinante de *B. thuringiensis* em gel de SDS-PAGE a 12%. Poço, marcador de massa molecular Rainbow (GE); Poço 2, perfil proteico da estirpe Bt Cry⁻; Poço 3, perfil protéico dos cristais purificados da estirpe de Bt recombinante expressando o gene *cry1Ba6*; Poço 4, perfil protéico dos cristais purificados da estirpe selvagem S601.

3.2.3 – Microscopia eletrônica

A mistura espora-cristal da proteína Cry1Ba6 produzidos pela estirpe BtCry1Ba6 foram visualizados por microscopia eletrônica de varredura e transmissão. Ambas as técnicas mostraram a presença de cristais rombóides (Fig. 3.7 A e B) levemente arredondados, que diferiam morfológicamente dos cristais bipiramidais encontrados na estirpe S601 (Fig 3.7 C). Esta diferença pode ser devida à presença de outras proteínas expressas pela estirpe selvagem S601 durante a montagem do cristal.

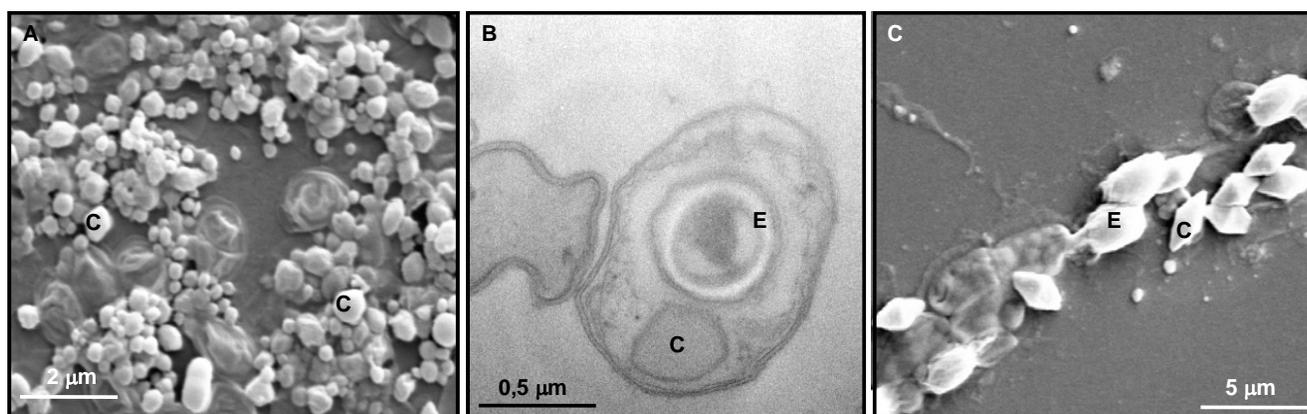


Figura 3.7: Análise ultraestrutural da mistura espora/cristal da estirpe recombinante BtCry1Ba6. A, Microscopia eletrônica de varredura (MEV) da mistura espora/cristal da estirpe recombinante BtCry1Ba6; B, Microscopia eletrônica de transmissão (MET) da mistura esporos/cristal da estirpe recombinante BtCry1Ba6; C, MEV da mistura esporos/cristal da estirpe selvagem S601 (C, Cristais, E, esporos).

3.3 – Ensaio de toxicidade da proteína recombinante Cry1Ba6 para *A. grandis*

Larvas neonatas de *A. grandis* foram incubadas separadamente em dieta artificial contendo diferentes doses da proteína Cry1Ba6. Após uma semana de exposição, foi determinada a CL_{50} (Tab. 3.1). A CL_{50} da proteína recombinante Cry1Ba6 foi menor ($305,32 \mu\text{g.mL}^{-1}$) do que a estirpe referência Btt, que é tóxica para coleópteros ($380,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$), mas sem diferença estatística. Quando comparada com a estirpe S601, que apresentou uma CL_{50} da $140,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$, a estirpe recombinante mostrou diferença estatística com um LC_{50} 2,1 vezes maior do que o tipo selvagem.

Tabela 3.1: Bioensaio contra *A. grandis* usando a proteína Cry1Ba6 expressa em *B. thuringiensis*.

Estirpe	N	CL ₅₀ (µg.mL ⁻¹) ^a
S1122 (Btt)	25	380,8 (230,0 – 440,0) ^b
S601	25	140,2 (110,0 – 170,0)
Cry1Ba6	25	305,32 (288,2 – 320,4)

^a – Os resultados são expressos como a média em três experimentos independentes.

^b – os números entre parêntesis correspondem ao intervalo de confiança a 95%.

3.4 – Perfil bidimensional e espectrometria de massa de proteínas da estirpe S601

Uma vez que foi detectada somente a presença do gene *cry1Ba* na estirpe S601, e o seu produto de expressão em estirpe acristalífera de Bt não apresenta toxicidade tão elevada quanto a estirpe selvagem, foi feita uma análise bidimensional de proteínas produzidas pela estirpe S601 (Fig. 3.8) para tentar detectar a presença de alguma outra toxina que possa estar contribuindo para a mortalidade dos insetos.

O perfil bidimensional da estirpe S601 mostrou concordância com o perfil obtido por SDS-PAGE. Uma banda forte de 140 kDa e uma mais fraca de 65 kDa, normalmente encontrada como produto de ativação da protoxina de 140kDa, para proteínas da família Cry1.

Foram observados conjuntos de *spots* de mesma massa molecular e diferentes *pIs*, indicando serem isoformas do mesmo polipeptídeo (Fig. 3.8).

Um total de 13 *spots* foram excisados manualmente a partir do gel bidimensional da estirpe S601, a análise por MALDI-TOF/TOF, revelou serem todos os *spots* proteínas Cry1Ba, confirmando os resultados já obtidos.

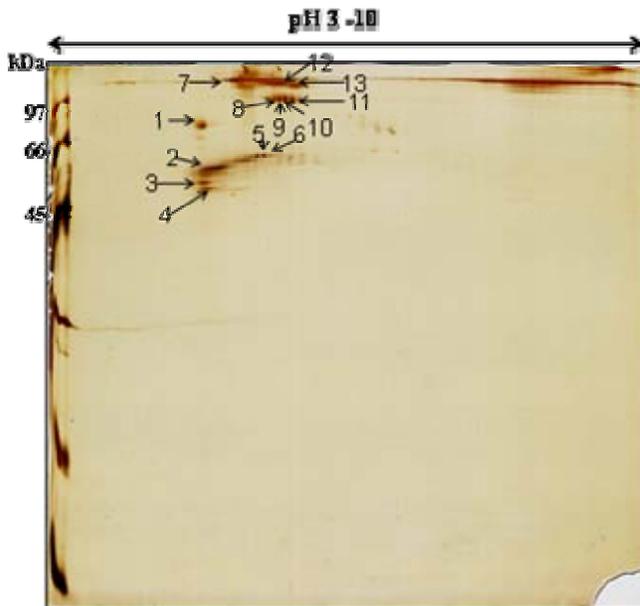


Figura 3.8 – Perfil bidimensional de proteínas dos cristais purificados da estirpe S601. A eletroforese foi realizada com *strip* pH 3 – 10 de 18 cm na primeira dimensão e SDS-PAGE 12% na segunda dimensão. As setas indicam os *spots* analisados. Conjuntos de *spots* podem ser observados em 7, 12 e 13; 8, 9, 10 e 11; 5 e 6.

3.5 – Ensaio de ligação e de competição homóloga

Uma vez que foi detectada a atividade tóxica da proteína recombinante Cry1Ba6 para *A. grandis*, foi analisada a sua capacidade de ligação ao intestino médio de larvas de *A. grandis*. BBMVs obtidas a partir do intestino médio de *A. grandis* foram incubadas com a proteína recombinante Cry1Ba6 biotinizada e ativada. A análise da ligação mostrou que a toxina liga-se a BBMVs e que a ligação foi específica, uma vez que esta não foi detectada, quando na presença de altas concentrações da toxina Cry1Ba6 não marcada (Fig. 3.9).

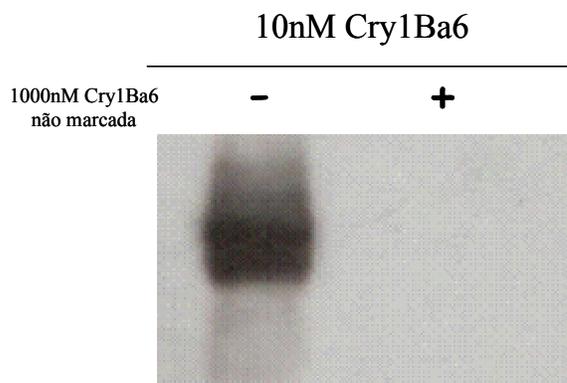


Figura 3.9: Ensaio de competição homóloga entre vesículas de microvilosidade intestinal (BBMV) isoladas de *A. grandis* com a toxina recombinante Cry1Ba6. A toxina Cry1Ba6 biotinilada e ativada com tripsina foi incubada com BBMV na ausência e na presença da mesma toxina ativa não marcada em uma concentração 100 vezes maior. Após 1 h de incubação, as toxinas não incorporadas foram removidas, e as vesículas contendo toxinas ligadas foram analisadas em gel de SDS-PAGE e transferidas para membrana de nitrocelulose. Proteínas marcadas foram visualizadas por incubação da membrana com estreptavidina conjugada a peroxidase e luminol. Poço 1, Cry1Ba6 marcada (10 nM), sem competidor, Poço 2, Cry1Ba6 marcada (10 nM) + 1000 nM de Cry1Ba6 não marcada.

3.5 – Análise de proteínas ancoradas a GPI que interagem com Cry1Ba6

Para determinar se proteínas do tipo ALP ou APN ancoradas a GPI estão envolvidas na ligação da proteína Cry1Ba6 às BBMVs de *A. grandis*, a ligação da toxina Cry1Ba6 às BBMVs, às BBMVs tratadas com PIPLC e às proteínas purificadas por cromatografia de afinidade foram comparadas (Fig. 3.10). A proteína Cry1Ba6 ligou-se a duas proteínas, de 62 e 65 kDa, em todas as preparações.

Foi demonstrado em diferentes trabalhos, que algumas toxinas da família Cry1 são capazes de se ligar a proteínas receptoras do tipo ALP ou APN ancoradas a GPI no intestino médio de insetos suscetíveis (Pigott e Ellar, 2007, Fernandez *et al.*, 2006). Para determinar a que tipo de proteína, a toxina Cry1Ba6 se liga a atividade enzimática de APN e ALP, foi mensurada, nas três frações analisadas (Tab. 3.2). A atividade para ALP e APN foi detectada tanto na fração contendo BBMVs, quanto na fração contendo as BBMVs tratadas com PIPLC, que cliva, de forma geral, proteínas ancoradas a GPI, o que já era esperado, uma vez que membranas biológicas são ricas nestes tipos de proteínas. Por outro lado, as proteínas obtidas por cromatografia de afinidade apenas apresentaram atividade

para ALP, demonstrando que um provável receptor para a proteína Cry1Ba6 em *A. grandis* poderia ser uma ALP.

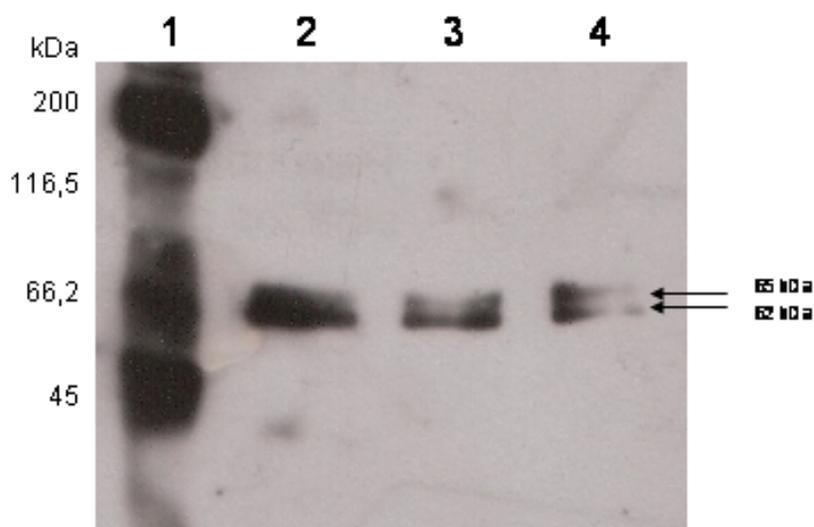


Figura 3.10: Caracterização de proteínas ancoradas a GPI de BBMVs de *A. grandis*, envolvidas na ligação à toxina Cry1Ba6. Autoradiografia mostrando ligação de Cry1Ba6 (10 nM) a BBMVs (10 µg). Poço 1: marcador de proteína biotilado (“biotinylated protein marker”, BioRad); Poço 2: Cry1Ba6 biotilada e ligada às BBMVs; Poço 3: Cry1Ba6 biotilada e ligada às BBMVs previamente tratadas com PIPLC e Poço 4: Cry1Ba6 biotilada e ligada às proteínas e purificadas por cromatografia de afinidade. Setas mostram os polipeptídeos de 65 e 62 kDa observados.

Tabela 3.2: Detecção da atividade específica das enzimas fosfatase alcalina (ALP) e aminopeptidase (APN) em amostras de vesículas de microvilosidades intestinal de *A. grandis* não tratada (BBMV), tratada com PIPLC (BBMV/PIPLC) e purificadas por cromatografia de afinidade.

Amostra	Atividade de ALP (nmol/L.mL ⁻¹ .min ⁻¹ /µg) ^a	Atividade de APN (µmol/L.mL ⁻¹ .min ⁻¹ /µg) ^a
BBMV	113,88 ± 15	51,38 ± 21
BBMV/PIPLC	130,83 ± 16	135,85 ± 38
Purificado da cromatografia de afinidade de Cry1Ba6	194,44 ± 32	ND

^a – Os resultados são expressos como a média ± SD em três experimentos independentes. ND: atividade não determinada.

3.6 – Análise ultraestrutural do intestino médio de larvas de *A. grandis* incubadas com a proteína Cry1Ba6 recombinante marcada.

Para confirmar a ligação da toxina Cry1Ba6 às BBMVs de *A. grandis*, secções ultrafinas de intestino médio de larvas de *A. grandis* foram incubadas com a proteína Cry1Ba6 biotinizada, seguida por incubação com estreptavidina conjugada com ouro e observadas em um microscópio eletrônico de transmissão (Fig. 3.11). As imagens mostraram a presença de partículas de ouro ao longo das microvilosidades do intestino médio dos tecidos tratados com a toxina Cry1Ba6 marcada (Fig. 3.11 B), indicando haver ligação da toxina Cry1Ba6 aos prováveis receptores distribuídos ao longo das microvilosidades apicais de células do intestino médio. Nos cortes incubados com BSA biotinizada, usada como controle, não foi possível visualizar ligação (Fig. 3.11A).

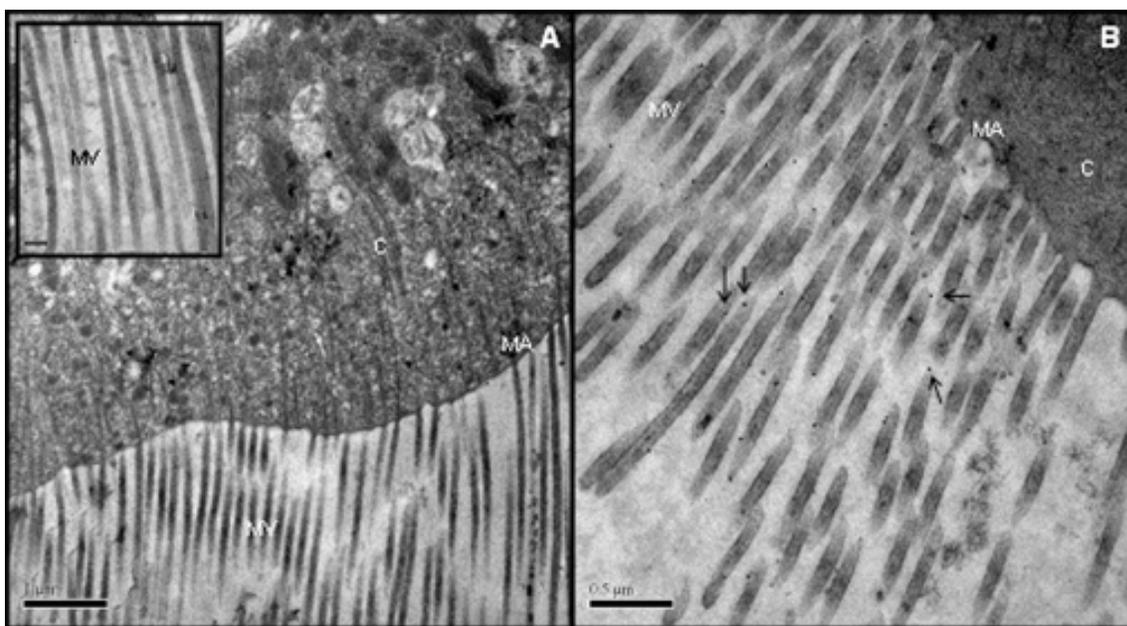


Figura 3.11: Detecção da ligação da toxina Cry1Ba6 às microvilosidades intestinais de *A. grandis*. Micrografia eletrônica de cortes ultrafinos de intestino de *A. grandis* tratados com estreptavidina conjugada com ouro, que se liga com proteínas biotinizadas. A, células do intestino médio de *A. grandis* tratadas com 30 nM de BSA biotinizada e Nanogold® streptavidin (\varnothing - 1,5 nm/Invitrogen), barra corresponde a 1,0 μ m; B, células do intestino médio de *A. grandis* tratadas com 30 nM de Cry1Ba6 biotinizada e Nanogold® streptavidin, barra corresponde a 0,5 μ m. MV, microvilosidades, C, células do intestino médio; MA, membrana plasmática.

O ensaio de competição homóloga por imunomarcação, ratificou os resultados obtidos no ensaio de competição homóloga, mostrando que a ligação da toxina Cry1Ba às microvilosidades de *A. grandis* é específica uma vez que, quando os cortes foram incubados com a toxina Cry1Ba não marcada a 100 nmol.L^{-1} ainda foi observada a ligação da toxina marcada (Fig. 3.12 A), porém, quando incubou-se com 1000 nmol.L^{-1} da toxina Cry1Ba não marcada, a ligação não foi mais detectada (Fig. 3.12 B).

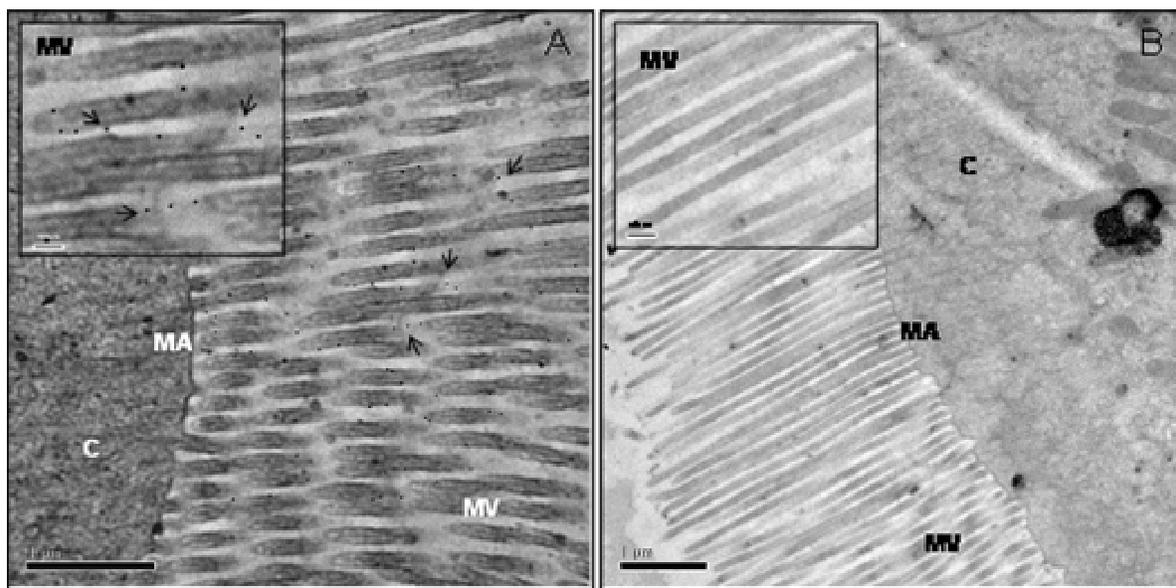


Figura 3.12: Detecção de ligação específica da toxina Cry1Ba6 às microvilosidades intestinais de *A. grandis*. Micrografia eletrônica de cortes ultrafinos de intestino de *A. grandis* tratados com estreptavidina conjugada com ouro, que reconhece proteínas biotinizadas. A: células do intestino médio de *A. grandis* tratadas com 100 nM de Cry1Ba não marcada, 30 nM de Cry1Ba biotinizada e Nanogold[®] streptavidin (\varnothing - 1,5 nm/Invitrogen); B: células do intestino médio de *A. grandis* tratadas com 1000 nM de Cry1Ba não marcada, 30 nM de Cry1Ba6 biotinizada e Nanogold[®] streptavidin. MV, microvilosidades, C, células do intestino médio; MA, membrana plasmática. Barras correspondem a 1,0 μm .

4 – Discussão

O gene *cry1B* foi clonado e seqüenciado pela primeira vez em 1988 por Brizzard e Whiteley, mas sem descrição da sua atividade inseticida. Hofte e Whiteley (1989), revelaram que o gene *cry1B* codificava uma proteína de 140 kDa, que apresentava identidade de aminoácidos com a região C-terminal de algumas toxinas da família Cry1. A região N-terminal apresenta semelhanças com proteínas da família Cry3 (Bradley *et al.*, 1995), sugerindo que essa proteína Cry poderia ter toxicidade para insetos das ordens Lepidoptera e Coleoptera. Bradley *et al.* (1995), através de bioensaios seletivos, demonstraram que a proteína Cry1B era tóxica para *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae), *Artogeia rapae* (Lepidoptera: Pieridae), *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae), *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae), *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) e *Chrysomela scripta* (Coleoptera: Chrysomelidae). Zhong *et al.* (2000), demonstraram a toxicidade de Cry1Ba1 para *C. scripta* e *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae). Arrieta *et al.* (2004), relataram toxicidade para *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). Nathan *et al.* (2006), por sua vez, relataram toxicidade para larvas de *S. frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) e finalmente Martins *et al.* (2007), demonstraram que o gene *cry1B* estava presente em estirpes de Bt ativas contra *A. grandis* e propuseram que esta proteína poderia estar envolvida na toxicidade para este inseto-praga.

Neste trabalho, o gene *cry1Ba6* da estirpe S601 de *B. thuringiensis* foi clonado e expresso em uma estirpe de Bt acristalífera. A sequência desse gene revelou 99% de identidade com o gene *cry1Ba* descrito por Brizzard e Whiteley (1988) (GenBank X06711). A proteína Cry1Ba6 foi testada em larvas neonatas de *A. grandis* e apresentou atividade tóxica quando comparada à estirpe de *B. thuringiensis* (Btt), que é a estirpe padrão para insetos coleópteros. No entanto, a toxina Cry1Ba6 apresentou uma CL₅₀ maior do que a obtida para a estirpe selvagem S601. Este resultado indica que pode existir outras proteínas, ainda não descritas, na estirpe S601 que melhoram a atividade tóxica desta estirpe.

A análise bidimensional da estirpe S601 revelou que as proteínas aparentemente mais significativas da estirpe são do tipo Cry1B, mas outros *spots* deverão ser analisados a

fim de buscar outras proteínas ou peptídeos desta estirpe que possam estar influenciando na mortalidade dos insetos.

O gel com o perfil protéico de cristais purificados da estirpe recombinante BtCry1Ba6 mostrou a presença de um polipeptídeo de massa molecular de 140 kDa e a microscopia eletrônica transmissão e de varredura dos cristais revelou sua forma rombóide, diferindo da morfologia do cristal pela estirpe S601, que tem um formato bipiramidal (Martins *et al.*, 2007). Esta alteração morfológica deve estar associada com a expressão de outras proteínas pela estirpe selvagem S601 durante a formação e montagem do cristal.

A expressão da proteína Cry1B em diferentes culturas transgênicas como o arroz (*Oryza sativa*), milho (*Zea mays*) ou batata (*Solanum tuberosum*) conferiu resistência a diversas pragas como *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Crambidae), *Diatrea grandiosella*, *D. saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae), *S. frugiperda* e *Phthorimaea opercuella* (Lepidoptera: Gelechiidae) [Breitler *et al.* (2000), Bohorova *et al.* (2001), Meiyalagham *et al.* (2006)]. O fato de o gene *cry1B* ter sido expresso com sucesso em diferentes culturas transgênicas, e desta proteína conferir resistência às plantas ao ataque de insetos pode indicar que a expressão do gene *cry1B* em plantas transgênicas de algodão (*Gossypium sp.*) poderia ser útil para o controle de *A. grandis*, a principal praga desta cultura.

O ensaio de ligação da toxina recombinante Cry1Ba6 mostrou que esta se liga especificamente às BBMV's de *A. grandis*. Trabalhos anteriores demonstraram que proteínas Cry, após ativação por proteases do intestino médio do inseto-alvo, ligam-se a receptores específicos localizados nas microvilosidades do intestino médio de insetos susceptíveis das ordens Lepidoptera (Hoffmann *et al.*, 1988a, b), Coleoptera (Bravo *et al.*, 1992) e Diptera (Hofte e Whiteley, 1989; Ravoahangimalala *et al.*, 1993). O reconhecimento da toxina Cry por receptores específicos é um fator determinante para a especificidade e atividade destas toxinas. O principal mecanismo de resistência às toxinas Cry são mutações que afetam a interação toxina-receptor (Ferré e Van Rie, 2002, Fernandez *et al.*, 2008). Estes dados têm motivado a caracterização de receptores para compreensão destes mecanismos de reconhecimento e ligação (Monnerat e Bravo, 2000). A compreensão da base molecular da interação toxina-receptor será útil para o desenvolvimento de novas plantas transgênicas contendo genes *cry* (cultivares Bt), com diferentes toxinas, contribuindo para a gestão da resistência dos insetos no campo. A maior

parte dos estudos têm sido realizados com larvas de lepidópteros e com toxinas da família Cry1 (Pietrantonio e Gill, 1996; Pigott e Ellar, 2007). Poucos estudos foram feitos em larvas de coleópteros ou de dípteros (Belfiore *et al.*, 1994, Soberón *et al.*, 2007 a,b). Este trabalho é o primeiro relato sobre a localização de receptores para toxina Cry no intestino médio de *A. grandis*.

Alguns receptores de toxinas Cry foram anteriormente caracterizados (Pigott e Ellar, 2007). Dentre os receptores já caracterizados, os melhores descritos são do tipo APN (Pacheco *et al.*, 2009, Rajagopal *et al.*, 2003, Gill *et al.*, 1995a, b, Knight *et al.*, 1994, Sangadala *et al.*, 1994) e do tipo caderina (Gahan *et al.*, 2001, Valaitis *et al.*, 2001, Nagamatsu *et al.*, 1998a, b, Vadlamudi *et al.*, 1995), identificados em lepidópteros. Em nematóides, acredita-se que glicolipídeos estejam envolvidos na interação da toxina Cry aos receptores (Griffitts *et al.*, 2005). Outros possíveis receptores incluem ALP (Fernandez *et al.*, 2006, Jurat-Fuentes e Adang, 2006, Jurat-Fuentes e Adang, 2004), um glicoconjugado de 270 kDa (Valaitis *et al.*, 2001), e uma proteína de 252 kDa (Hossain *et al.*, 2004).

Neste trabalho, foi possível demonstrar que a proteína Cry1Ba6 liga-se a duas proteínas, de 65 e 62 kDa derivadas de BBMV de *A. grandis*. Estas proteínas foram purificadas por cromatografia de afinidade. Sabe-se que estas proteínas estão em uma fração rica em atividade de fosfatase alcalina sendo assim, possivelmente elas pertençam a este grupo. Em larvas de dípteros e de outros lepidópteros, ALP foram identificadas como receptores de toxinas Cry. As proteínas Cry4B e Cry11A se ligam a duas proteínas, de 65 e 62 kDa em BBMV de *A. aegypti* (Buzdin *et al.*, 2002), que também foram descritas como ALPs (Fernandez *et al.*, 2006). Uma ALP de 68 kDa ancorada a GPI, foi identificada como sendo o receptor para proteína Cry1Ac em *H. virescens*, (Jurat-Fuentes e Adang, 2004). Do mesmo modo, foi identificada em *M. sexta*, uma ALP de 65kDa ancorada a GPI, como sendo o receptor para proteína Cry1Ac. (McNall *et al.*, 2003). Interessantemente, foi detectada redução dos níveis de expressão de uma ALP em uma estirpe de *H. virescens* resistente a Cry1Ac, apoiando o seu papel funcional como receptor (Jurat-Fuentes e Adang, 2004).

A ligação da proteína Cry1Ba6 as microvilosidades de *A. grandis*, foi visualizada por microscopia eletrônica de transmissão utilizando avidina conjugada com partículas ouro. Neste trabalho, foi demonstrado pela primeira vez que a proteína Cry1Ba6 de *B.*

thuringiensis é tóxica para *A. grandis* e que a toxina liga-se a duas proteínas ancoradas a GPI, com atividade de fosfatase alcalina, nas microvilosidades intestinais deste inseto-praga.

O próximo passo agora será determinar a sequência dessas proteínas do intestino médio de *A. grandis*, prováveis receptoras para a toxina Cry1B, o que poderá ajudar a melhorar a compreensão da estrutura desses receptores e o modo de ação das toxinas Cry.

CAPÍTULO IV

"Nada na vida deve ser receado. Tem apenas que ser compreendido". (Marie Curie)

ANÁLISE DA ATIVIDADE DAS PROTEÍNAS Cry1Ia e Cry10A EXPRESSAS EM *B. thuringiensis*

1. Introdução

Bacillus thuringiensis (Bt) é uma bactéria Gram positiva, caracterizada pela produção de proteínas na forma de cristais, durante a esporulação, com atividade inseticida. Estas proteínas possuem alta toxicidade para larvas de diferentes ordens de insetos e de certas espécies das ordens Nematoda, Protozoa e Acari (Feiltelson 1994). Estas proteínas são conhecidas como δ -endotoxinas, ou proteínas Cry e Cyt, devido à sua natureza (Kostichka *et al.*, 1996; Monnerat e Bravo 2000). Mais de 350 genes *cry* foram sequenciado e as suas proteínas são classificadas em 58 grupos organizados em diferentes subgrupos, de acordo com seus níveis de identidade de aminoácidos. A atualização da informação destes dados pode ser vista no website: http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/.

Taylor *et al.* (1992), descreveu o primeiro gene *cryIIa*, que codifica para uma proteína com 81 kDa com 62% de identidade com o gene *cryIBa*. Após a ativação por proteólise, estas proteínas são clivados em toxinas ativas de cerca de 65 kDa, com atividade inseticida descrita para *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae) e para *Leptinotarsa decimlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) (Taylor *et al.* 1992; Tounsi *et al.* 2003).

Em 2008, Martins *et al.* demonstraram que duas estirpes de Bti (S1806 e S1989), pertencentes ao Banco de *Bacillus* da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, possuíam atividade tóxica significativa para *A. grandis*. Em outro trabalho, foram testadas as atividades das quatro principais toxinas constituintes de Bti (Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa e Cyt1Aa) isoladamente e em diferentes combinações, para *A. grandis* (Monnerat *et al.*, 2006). Essas toxinas não mostraram atividade tóxica para *A. grandis*, sugerindo que outras proteínas (Cry10Aa, Cyt2Ba e Cyt1Ca) codificadas por genes do plasmídeo pBtoxis poderiam estar envolvidas na atividade tóxica dessa estirpe. Aguiar *et al.* (2007) mostrou,

então, que a toxina Cry10A expressa em sistema baculovírus possuía alta atividade para este inseto.

O algodão é uma das mais importantes culturas cultivadas em todo o mundo. O algodão representa uma das cadeias produtivas mais importantes no Brasil e no mundo, pois gera milhares de empregos diretos e indiretos e, anualmente só a indústria brasileira de algodão gera cerca de US\$ 1,5 bilhões (Martins *et al.* 2008). Várias pragas atacam a cultura do algodão, e entre elas destaca-se o bicudo do algodoeiro, *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae), importante, devido ao seu poder destrutivo e seu difícil controle (Martins *et al.* 2008). O ataque não controlado deste inseto pode levar a danos em cerca de 75% da produção de fibras de algodão (Martins *et al.*, 2008). A lagarta militar, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), também de difícil controle, por ser polífaga é também uma importante praga do algodão. No Brasil, esse inseto é encontrado em diferentes culturas, como milho, sorgo, arroz, trigo, alfafa, feijão, amendoim, tomate, algodão, batata, repolho, espinafre, abóbora e couve (Monnerat *et al.*, 2007).

Neste cenário, *Bacillus thuringiensis* surge como um candidato natural como fonte genes de resistência a insetos, para o controle de pragas, levando a diminuição do uso excessivo de pesticidas.

Este trabalho descreve a clonagem e expressão, no sistema homólogo de Bt, de duas toxinas, Cry11a (com atividade tóxica descrita para *A. grandis* e *S. frugiperda*) e Cry10 (com atividade tóxica descrita para *A. grandis*) usando dois vetores diferentes. Além disso, o estudo faz uma comparação entre as proteínas produzidos quanto à morfologia dos cristais, a atividade tóxica e a capacidade de ligação a BBMV's de *A. grandis* e *S. frugiperda*.

2. Materiais e Métodos

2.1 – Clonagem dos genes *cry11a* e *cry10* em vetores de expressão para *B. thuringiensis*

2.1.1 – Construção do plasmídeo pHT*cry11a*

Para construção do plasmídeo pHT*cry11a*, foram desenhados quatro oligonucleotídeos, 1IPFw (5'ggatccgctcgagtgttaacttcggttg3') e 1IPR (5'tcttgattcttagtttcatagctccaactctcctaate 3') e *cry11a*Fw (5'gattagggagagtggagctATGaaactaaagaatc3') e *cry11a*R (5'ggatccctacatgttacgctcaatattg 3'). As amplificações das sequências da região promotora e do gene *cry11a* foram feitas através de reações de PCR. Brevemente, foram utilizados 5 µL do tampão 5 X da *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), e 0,5 µL da mistura dos quatro dNTPs (de uma solução estoque 10 mmol.L⁻¹), 0,5 µL de cada um dos oligonucleotídeos (de uma solução estoque 10 µmol.L⁻¹), uma unidade da enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), 2 µL de MgCl₂, 1 µL do DNA do plasmídeo pHT>10Kb (Cedido pelo Dr. Colin Berry, University of Cardiff, este plasmídeo contém a região promotora do gene que codifica a proteína Cry48Aa e Cry49Aa) ou do plasmídeo pGem*cry11a* (Martins *et al.*, 2008) (100ng) e água “Milli-Q[®]” para um volume final de 25 µL. O programa da PCR utilizado para a amplificação foi: 95 °C/5 min, 35 ciclos de 95 °C/1min e 30s, 60 °C/1min e 30s, 72 °C/1min e 30s, seguido de uma extensão final de 72°C/7 min. Os produtos das reações de PCR foram analisados em géis de agarose na concentração de 0,8%. Os fragmentos correspondentes à região promotora e ao gene *cry11a*, de 201pb e 2.196pb respectivamente, foram eluídos e purificados com o kit GFX[®] Purification System (GE Helthcare) de acordo com as instruções do fabricante. Os DNAs purificados foram submetidos a uma reação de PCR “overlap”, uma vez, que os oligonucleotídeos PR e *cry11a*Fw, possuem uma porção da sequência complementar. Para esta reação, foram usados 50ng do DNA da região promotora e do DNA do gene *cry11a*, e os oligonucleotídeos PFW e *cry11a*R. As condições de reação e programa utilizados foram os mesmos descritos acima. O produto da reação de PCR foi analisado em gel de agarose na concentração de 0,8%. O fragmento amplificado foi denominado P*cry11a*.

O fragmento P*cry11a* foi eluído e purificado com o kit GFX[®] Purification System (GE Helthcare). Após purificação, foi feita uma ligação deste fragmento (20ng) ao vetor de clonagem pGem T-easy[®] (Promega), segundo as recomendações do fabricante. Posteriormente, foi feita a transformação de células DH5α, por choque-térmico (Sambrook *et al.*, 2001) com 5 µL da ligação. O esquema da construção do plasmídeo pGemPCry11a está demonstrado na Figura 4.1. Os clones positivos foram confirmados através de PCR usando-se os oligonucleotídeos PFW e *cry11a*R. Após confirmação da clonagem, o

plasmídeo denominado pGemPcry11a e uma das colônias positivas foi inoculada em 5 mL de meio Luria-Bertani (LB) com 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de ampicilina e cultivada por 16 h a 37 °C. O DNA deste clone foi extraído com o kit Wizard[®] Plus SV Minipreps (Promega).

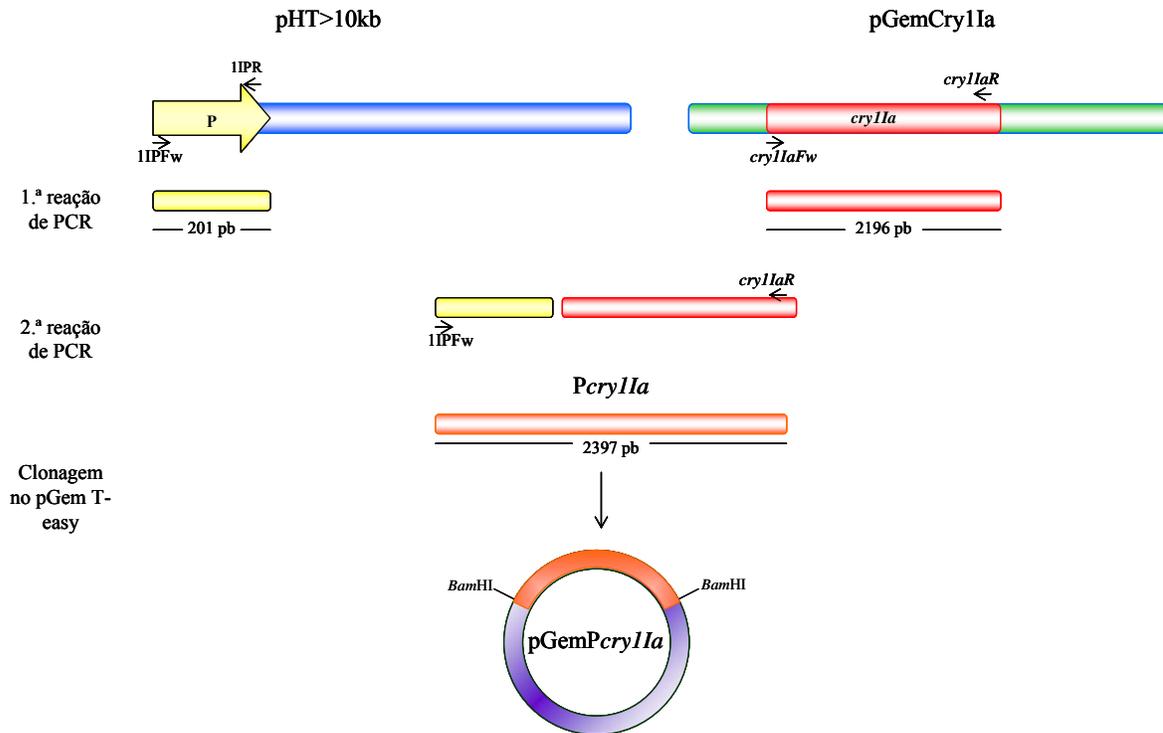


Figura 4.1 – Esquema de amplificação e clonagem do gene *cry11a*. A primeira reação de PCR mostra o esquema de amplificação do fragmento de 201 pb correspondente à região promotora do plasmídeo pHT >10 kb usando os oligonucleotídeos 1IPFw e 1IPR e do fragmento de 2196 pb correspondente ao gene *cry11a* do plasmídeo pGemCry11a (Martins *et al.*, 2008) usando os oligonucleotídeos *cry11aFw* e *cry11aR*. A segunda reação de PCR mostra a junção dos fragmentos obtidos na reação anterior, usando os oligonucleotídeos 1IPFw *cry11aR*, obtendo o fragmento de 2397 pb, que foi clonado no vetor pGem T-easy[®] gerando o plasmídeo pGemPCry11a.

Os plasmídeos pHT315 (gentilmente cedido pelo Dr. Colin Berry, University of Cardiff – Fig. 4.2) e pGemPcry11a foram digeridos com a enzima *Bam*HI. O plasmídeo pHT315 foi desfosforilado por reação utilizando a enzima CIAP[®] (Promega) seguindo as recomendações do fabricante. O fragmento do gene *cry11a* (30ng) digerido com *Bam*HI foi ligado ao plasmídeo pHT315 (10ng) com o uso da enzima T4 DNA polimerase[®] (Promega).

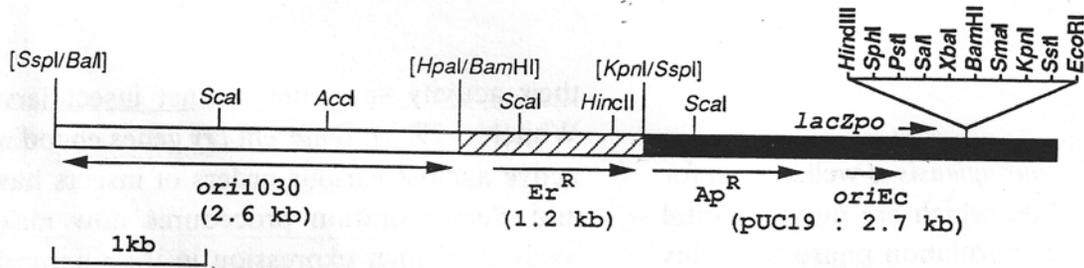


Figura 4.2 – Mapa físico do plasmídeo pHT315. ori1030 – origem de replicação em *bacillus*; Er^R – gene re resistência a eritromicina; Ap^R - gene re resistência a ampicilina e oriEc - origem de replicação de *E. coli*.

Posteriormente, foi feita a transformação de células de *E. coli* DH5 α , por choque-térmico (Sambrook *et al.*, 2001) com 5 μ L da ligação do plasmídeo pHT+P*cry11a*. Os clones positivos foram confirmados através de PCR usando-se os oligonucleotídeos P*FW* e *cry11aR*. Após confirmação da clonagem, uma das colônias positivas foi inoculada em 5 mL de meio LB com 100 μ g.mL⁻¹ de ampicilina e crescida por 16 h a 37 °C. O DNA deste clone foi extraído com o kit Wizard[®] Plus SV Minipreps (Promega). O gene foi novamente seqüenciado para confirmar a identidade do fragmento clonado e verificar se houve alguma alteração na sequência dos nucleotídeos.

2.1.2 – Clonagem do gene *cry10* em um vetor de expressão para *B. thuringiensis*

O plasmídeo contendo o gene *cry10* (pGem*cry10A* – Aguiar *et al.*, 2007) foi digerido com as enzimas *SphI* e *SalI*, e o fragmento de 2.100 pb foi separado por eletroforese em gel de agarose a 0,8% e eluído do gel (Sephaglass[™] Bandprep Kit, Pharmacia), de acordo com protocolo fornecido pelo fabricante. O fragmento purificado foi sub-clonado no vetor pSVP27A, gentilmente cedido pelo Dr. David Ellar, university of Cambridge - UK (Crickmore e Ellar, 1992; Crickmore *et al.*, 1990), previamente digerido com as enzimas *SphI* e *SalI*, levando ao plasmídeo recombinante pSVP*cry10A*. Células de *E. coli* DH5 α foram transformadas, por choque-térmico (Sambrook *et al.*, 2001) com 5 μ L da ligação do plasmídeo pSVP*cry10A*. Os clones positivos foram confirmados através de PCR usando-se os oligonucleotídeos *cry10Fw* e *cry10R*. Após confirmação da clonagem, uma das colônias positivas foi inoculada em 5 mL de meio LB com 100 μ g.mL⁻¹ de

ampicilina e crescida por 16h a 37 °C. O DNA deste clone foi extraído com o kit Wizard® Plus SV Minipreps (Promega). O gene foi novamente seqüenciado para verificar se houve alguma alteração na sequencia dos nucleotídeos.

2.1.3 – Transformação dos plasmídeos pHTcry1Ia e pSVPcry10A em *B. thuringiensis*

Um micrograma de DNA do plasmídeo pSVPcry10A foi subclonado na estirpe acristalífera de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* IPS78/11, gentilmente cedido pelo Dr. David Ellar, university of Cambridge - UK (Ward e Ellar, 1983) por eletroporação (1,8 kV, 400Ω e 25μF). *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* IPS78/11 foram preparadas para transformação por eletroporação da seguinte maneira: uma colônia foi inoculada em 10 mL de meio LB em tubo de 15 mL, incubada a 30 °C com agitação de 180 rpm em agitador orbital New Brunswick Scientific G-25, até atingir uma densidade óptica de 0,2 a 600 nm. Após o crescimento, o tubo contendo a cultura foi colocado em gelo por 10 min seguido de centrifugação a 2000 x g a 04 °C por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento obtido ressuscitado em um mL de sacarose 10% gelada e estéril. As células foram incubadas em gelo por 3 min e novamente centrifugadas a 2000 x g a 04 °C por 5 min. O sobrenadante foi novamente descartado e o sedimento ressuscitado em 250 μL de sacarose 10%.

Para a eletroporação, foram transferidos 120 μL das células e 1 μg do DNA do plasmídeo de interesse para cuvetas de quatro mm (previamente resfriadas em gelo). O DNA e as células foram incubados em gelo por 10 min, em seguida, foram adicionados 670 μL de sacarose 10% para completar o volume. A eletroporação foi feita em eletroporador Gene Pulser II (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) ajustado para @ 1,8 kV, 400 Ω e 25 μF. Após a eletroporação, um mL de meio LB foi adicionado à cuveta e toda a reação foi transferida para tubo de 15 mL e incubada a 30 °C por 1h com agitação de 180 rpm em agitador orbital New Brunswick Scientific G-25, para recuperação das células. Após recuperação celular, o plaqueamento foi realizado conforme descrito por Sambrook *et al.* (2001). As colônias de *B. thuringiensis* transformadas foram selecionadas por PCR usando-se oligonucleotídeos específicos para o gene *cry1Ia* (descritos anteriormente). E a presença do gene *cry10A* na estirpe de Bt recombinante foi checada por PCR usando os oligonucleotídeos *cry10Fw* (5'gggatccgggaggaatagatATGaatc3'), que se anela na posição -

20 a +7 do sítio de iniciação da tradução e *cry10R* (5'atagtgaatgatttttgaaggatcctttcc 3'), que se anela na posição + 2015 a + 2.042 do sítio de iniciação da tradução do gene *cry10A*.

2.2 – Análise da expressão de proteínas Cry expressas em *B. thuringiensis*

Os clones positivos foram crescidos em meio NYSM (Yousten, 1989) seletivo com 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de eritromicina (para células transformadas com pHTP*cry1Ia*) e 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de cloranfenicol (para células transformadas com pSVP*cry10*) a 30 °C por 72 h com agitação de 180 rpm em agitador orbital New Brunswick Scientific G-25. As proteínas foram extraídas de acordo com o protocolo descrito por Lecadet *et al.*, (1991) e, resolvidas em gel de SDS-PAGE a 12%, conforme Laemmli (1970), corado com Coomassie blue.

O padrão protéico resultante da expressão dos Bts recombinantes que expressam as proteínas Cry1Ia e Cry10A foram avaliados após 72h de crescimento a 28 °C em incubador rotativo a 200 rpm. Quinze microgramas das proteínas em questão e mais 15 microgramas de proteínas totais da estirpe de Bt acristalífero, foram colocados em tubo de microcentrífuga contendo tampão de amostra de proteína com 50% de β -mercaptoetanol® e foram incubados a 95 °C por 5 min. Em seguida, as amostras foram analisadas por eletroforese em dois géis desnaturantes de poliacrilamida SDS-PAGE a 12%, conforme Laemmli (1970). Um dos géis foi corado e fixado em solução de 40% MeOH, 10% AcOH e Azul de commasie 0,1%, por cerca de 16 h, sob leve agitação e descorado em solução de 40% MeOH, 10% AcOH por 2 h, sob leve agitação, ou com nitrato de prata (Blum *et al.*, 1987). O outro foi utilizado para transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose (GE Helthcare), para o experimento de imuno-deteção (“Western-blot”), de acordo com Harlow & Lane (1988). As proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose, usando-se os aparatos de transferência da Bio-Rad (Trans-Blot® SD – Semi Dry Transfer Cell, para transferência semi-seca), de acordo com o protocolo do fabricante e com tampão de transferência (25 mmol.L^{-1} Tris; 192 mmol.L^{-1} glicina; 20% metanol, pH 8,2). A membrana foi bloqueada com 3% de BSA e PBS 1X por 16 h, sendo em seguida processada e revelada usando o Kit Western Breeze® Chromogenic Immunodetection Protocol (Invitrogen), conforme protocolo fornecido pelo fabricante. Para deteção da proteína Cry1Ia foi usado o anticorpo anti-Cry1Ia (Martins *et al.*, 2008) na diluição de

1:200 e para detecção da proteína Cry10A foi usado o anticorpo anti-Cry10 (Aguiar, 2007) na diluição de 1:500.

2.3 – Bioensaio com a proteína recombinante

Para o ensaio com as proteínas recombinantes, os cristais das mesmas foram purificados por gradiente de sacarose de acordo com o protocolo descrito por Chang *et al.* (1993), com modificações. Os cristais foram recuperados utilizando uma solução de Triton X100 a 1% e PMSF 100 mmol.L⁻¹ e solubilizados com uma solução alcalina contendo tampão carbonato de sódio 50 mmol.L⁻¹ pH 10,5 com 0,2% (v/v) de β-mercaptoetanol por 1 h a 37 °C com agitação constante de 37 rpm (New Brunswick modelo Innova 2100). A amostra foi centrifugada por 5 minutos a 12.000 x g e as proteínas solúveis foram quantificadas usando-se reagente de Bradford (Bio Rad) (Bradford, 1976), seguindo as instruções do fabricante.

O bioensaio contra larvas neonatas de *A. grandis* foi realizado incorporando-se cada proteína recombinante em 5 mL de dieta, como descrito por Martins *et al.* (2007) e, em seguida, a dieta foi vertida em placa de Petri (15 mm x 20 mm). Após solidificação, foram feitos 5 furos por placa, e em cada furo foi colocada uma larva neonata. Foram testadas cinco doses (500 µg.mL⁻¹, 250 µg.mL⁻¹, 100 µg.mL⁻¹, 50 µg.mL⁻¹ e 25 µg.mL⁻¹) além de um grupo controle, não tratado. O bioensaio foi mantido em câmara de incubação com fotofase de 14:10h de claro/escuro e a uma temperatura de 27 °C. Para comparação dos resultados obtidos, foram feitos ensaios com cristais purificados da estirpe S1122 de *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* (Btt), que é a estirpe padrão para insetos da ordem Coleoptera. Para o ensaio com a estirpe S811 foi utilizada a cultura total, já que a proteína Cry1Ia não cristaliza e provavelmente se perderia durante a purificação dos cristais. Kostichka *et al.* (1996), demonstraram em seus trabalhos que esta é a proteína Cry1Ia é secretada na fase inicial da esporulação, esta proteína possui uma região que pode funcionar como um peptídeo sinal para *Bacillus*, que a endereça para o espaço periplásmico, deixando-a retida na membrana. A estirpe foi cultivada por 48h em meio NYSM (Yousten, 1984) a 28°C e 200 rpm, por 72 h. Em seguida, centrifugada a 12.800 x g por 30 min, a 4°C (centrífuga BR4i, Jouan), congelada por 16 h e liofilizada por 18 h em liofilizador

Labconco modelo Lyphlock modelo 18. Depois de liofilizada, realizou-se a dosagem de proteína total com o reagente de Bradford® (Bio Rad). Os ensaios foram repetidos por três vezes.

Uma semana após, fez-se a leitura do bioensaio e se determinou a CL_{50} , através de análise de Probits (Finney,1971). Os bioensaios foram repetidos três vezes e os valores de CL_{50} foram comparados por ANOVA usando o programa Sigma Stat (Kuo *et al.*, 1992).

O bioensaio contra larvas de segundo instar de *S. frugiperda* foi realizado segundo protocolo descrito por Monnerat *et al.* (2007). O bioensaio foi mantido em câmara de incubação com fotofase de 14:10h de claro/escuro e a uma temperatura de 27°C. Após sete dias, fez-se a última leitura do bioensaio e a CL_{50} , foi determinada através de análise de Probits (Finney,1971). Para comparação dos resultados obtidos, foram feitos ensaios com a estirpe S1450 de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk) que é a estirpe padrão para insetos da ordem Lepidoptera e expressa a proteína Cry1Ia.

2.4 – Caracterização morfológica dos cristais produzidos pelas estirpes recombinantes

A microscopia eletrônica de varredura foi feita a partir de 100 µL dos cristais purificados, que foram espalhados em uma base de metal, e secos à temperatura ambiente. O material foi então, coberto com ouro por 180s usando um aspersor “sputter coater” Emitech K550 (Ashford, Kent) e visualizados em microscópio eletrônico de varredura (DSM 962; Zeiss, Thornwood, NY).

2.5 – Ensaio de ligação de proteínas Cry recombinantes a BBMV de *A. grandis* e *S. frugiperda*

2.5.1 – Intestinos dos insetos de interesse

Os intestinos de larvas de terceiro instar de *A. grandis* e *S. frugiperda* foram retirados com auxílio de pinças e lavados e conservados em solução tampão (manitol 200 mmol.L⁻¹, DTT 1 mmol.L⁻¹ e Hepes-Tris 1 mmol.L⁻¹ pH 7,4) a -80 °C.

2.5.2 – Preparação de BBMVs

A - De intestino médio de *A. grandis*

Um grama de intestino médio de *A. grandis* foi homogeneizado em 5 mL de tampão de homogeneização (200 mmol.L⁻¹ de manitol, 10 mmol.L⁻¹ de ácido ascórbico, 5 mmol.L⁻¹ de EDTA, 0,2 mmol.L⁻¹ de leupeptina, 0,03% (m/v) PMSF, 2 mmol/L de DTT, 10 mmol.L⁻¹ de MES – pH 7,4 ajustado com Tris) durante 10s em aparelho homogeneizador blender-polytron a ¾ da velocidade máxima. Um mL de MgCl₂ a 24 mmol/L frio foi adicionado aos intestinos, que foram, então, incubados em gelo por 10 min. Em seguida, foram centrifugados a 6.000 x g por 10 min a 4 °C e o sobrenadante transferido para outro tubo e centrifugado novamente a 30.000 x g por 30 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado em um mL de tampão de estoque (200 mmol.L⁻¹ de manitol, 1 mmol.L⁻¹ de DTT e 1 mmol.L⁻¹ de HEPES-tris – pH 7,4). As BBMV's foram alíquotadas e armazenadas a -80 °C.

B - De intestino médio de *S. frugiperda*

Um grama de intestino médio de *S. frugiperda* foi homogeneizado em 10 mL de solução I (300 mmol.L⁻¹ de manitol, 17 mmol.L⁻¹ de tris HCl, 10 mmol.L⁻¹ de HEPES, 5 mmol.L⁻¹ de EGTA, 2 mmol.L⁻¹ de DTT, 1 mmol.L⁻¹ de EDTA, 1 mmol.L⁻¹ de PMSF – pH 7,4 ajustado com tris), foram dados nove golpes a 2.250 rpm em aparelho homogeneizador blender-polytron. Em seguida, foram adicionados 10 mL de MgCl₂ a 24 mmol.L⁻¹ frio, misturado delicadamente e incubado em gelo por 15 min. A reação foi centrifugada a 2.500 x g por 15 min a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e centrifugado novamente a 30.000 x g por 30 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado em 5 mL de solução I e 5 mL de MgCl₂ a 24 mmol.L⁻¹, misturado delicadamente e incubado em gelo por 15 min. A reação foi centrifugada a 2.500 x g por 15 min a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e centrifugado novamente a 30.000 x g por 30 min a 4 °C. O sobrenadante foi novamente descartado e o sedimento ressuspensionado em 5 mL de água Milli-Q[®] fria. Foram dados outros 3 golpes a 2.250 rpm em aparelho homogeneizador. Em seguida, a reação foi dializada uma vez contra 1L de tampão (150 mmol.L⁻¹ de KCl, 2 mmol.L⁻¹ de EGTA, 0,5 mmol.L⁻¹ de EDTA, 10 mmol.L⁻¹ de HEPES – pH 7,4 – a 4 °C) e as BBMV's foram alíquotadas e armazenadas a -80 °C.

2.5.3 – Proteínas usadas nos ensaios

Para este experimento, além das proteínas recombinantes expressas neste trabalho (Cry1Ia e Cry10A expressas em Bt), foram usadas as proteínas expressas em sistema Baculovírus Cry1Ia (Martins *et al.*, 2008), Cry10 (Aguiar *et al.*, 2007) e poliedrina.

2.5.4 – Biotinilação das proteínas

As proteínas recombinantes Cry1Ia e Cry10A (expressas em Bt), Cry1IAa (produzidas em células de inseto pela infecção com o vírus recombinante vSynBtcry1IAa), Cry10Aa (produzidas em células de inseto pela infecção com o vírus recombinante vSynCry10Aa) e os poliedros do vírus selvagem AcMNPV foram solubilizados em tampão carbonato 500 mmol.L⁻¹ pH 10,5 com 0,2% de β-mercaptoetanol por 2h a 37 °C com agitação constante de 37 rpm. Após solubilização, as proteínas foram quantificadas usando-se reagente de Bradford (Bio-Rad®). Em seguida, foi feita uma eletroforese em SDS-PAGE a 12 % para verificar a qualidade das amostras (foram aplicados 10 µg de cada proteína).

As proteínas solubilizadas foram então biotinizadas com auxílio do kit ECL Protein Biotinylation System (GE Helthcare) de acordo com as recomendações do fabricante. Após a biotinilação, foi feito um “western-blot” para confirmar a marcação das proteínas pela biotina

Primeiramente, procedeu-se uma eletroforese em SDS-PAGE a 12 % com 10 µg das amostras biotinizadas das proteínas Cry1IAa (expressa em Bt e células de insetos), Cry10Aa (expressa em Bt e células de insetos) e Poliedrina (AcMNPV). Os géis foram então transferidos para uma membrana de nitrocelulose (Hybond ECL-nitrocellulose membrane – GE Helthcare), a transferência foi realizada a corrente constante de 350 mA em sistema submarino (Hofer) por 40 min em tampão de transferência [25 mmol.L⁻¹ Tris, 192 mmol.L⁻¹ glicina e 20% metanol (v/v)]. A membrana foi incubada por 16 h com PBS 1X para que fosse renaturada e a visualização se deu por incubação da membrana com streptavidina-peroxidase conjugada (1:6000 - GE Helthcare) por 1h, seguida de incubação com SuperSignal chemiluminescence substrate (Pierce) segundo as recomendações do fabricante.

2.5.5 – Ensaio de ligação

A ligação foi realizada em 100 µL de tampão de ligação [PBS (pH 7.6), 0.1% (w/v) BSA, 0.1% (v/v) Tween 20]. Dez microgramas de BBMV's de *A. grandis* e *S. frugiperda* foram incubadas (separadamente) com as toxinas, Cry11Aa, Cry10Aa (expressas em baculovírus e Bt) e Poliedrina (expressa em baculovírus), biotinizadas (10 nmol.L⁻¹). As toxinas não ligadas foram removidas por centrifugação (10 min a 14000 x g). As BBMV's foram lavadas três vezes no tampão de ligação e ressuspensas em 15 µL de PBS 1X e 5 µL de tampão de amostra Laemmli 4X [0,125 mol.L⁻¹ Tris/HCl (pH 6.8), 4% (m/v) SDS, 20% (v/v) glicerol, 10% (v/v) 2-mercaptoetanol, 0.01% (m/v) Azul de Bromofenol]. As amostras foram fervidas por 3 min e resolvidas em SDS-PAGE a 9%.

As proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Hybond ECL-nitrocellulose membrane – GE Helthcare), a transferência foi realizada a corrente constante de 350 mA em sistema submarino (Hoefer) por 40 min em tampão de transferência [25 mmol.L⁻¹ Tris, 192 mmol.L⁻¹ Glicina e 20% metanol (v/v)]. A membrana foi incubada por 16 h com PBS 1X para que fosse renaturada. A ligação das toxinas marcadas com as BBMV's foi visualizada com streptavidina-peroxidase conjugada (1:6000 - GE Helthcare) por 1 h seguida de incubação com SuperSignal chemiluminescence substrate (Pierce) segundo as recomendações do fabricante.

3 – Resultados

3.1 – Construção dos plasmídeos pGemPcry11a e pHTPcry11a

A primeira reação de PCR utilizando Pfw e PR (que amplificam a região promotora) gerou um produto de amplificação de 201 pb (Fig. 4.3), que corresponde à região promotora do gene codificante da proteína Cry49Aa de *B. sphaericus*, já a reação de PCR realizada utilizando os oligonucleotídeos cry11aFw e cry11aR (que amplificam o gene *cry11a*) gerou um produto de amplificação de 2.196 pb (Fig.4.3).

As bandas purificadas correspondentes à região promotora e ao gene *cry11a* submetidas a *overlap* PCR geraram um produto único de amplificação de 2.397pb denominado Pcry11a (Fig. 4.4).

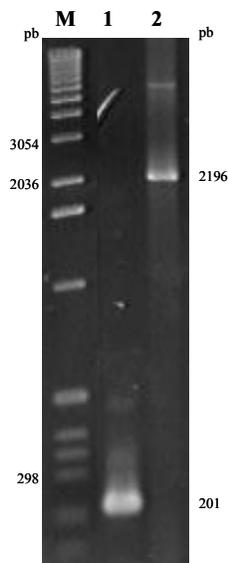


Figura 4.3 – Amplificação da região promotora do gene codificante da proteína Cry49Aa de *B. sphaericus* e do gene *cry11a* para *overlap* PCR. Eletroforese em gel de agarose a 0,8% mostrando em M, 1Kb DNA ladder da Invitrogen; 1, produto de amplificação correspondente à região promotora e 2, produto de amplificação correspondente ao gene *cry11a*.

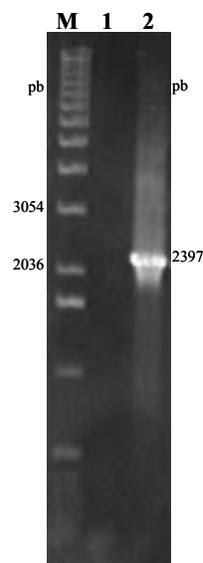


Figura 4.4 – *Overlap* PCR P + *cry11a*. Eletroforese em gel de agarose a 0,8%, mostrando em M, 1Kb DNA ladder da Invitrogen; 1, controle negativo e 2, produto de amplificação correspondente à região promotora + gene *cry11a*.

O produto da amplificação clonado no vetor pGemT-easy gerou o plasmídeo pGemP*cry11a*, confirmado por PCR (Fig. 4.5A) e digestão com a enzima *Bam*HI (Fig. 4.5B).

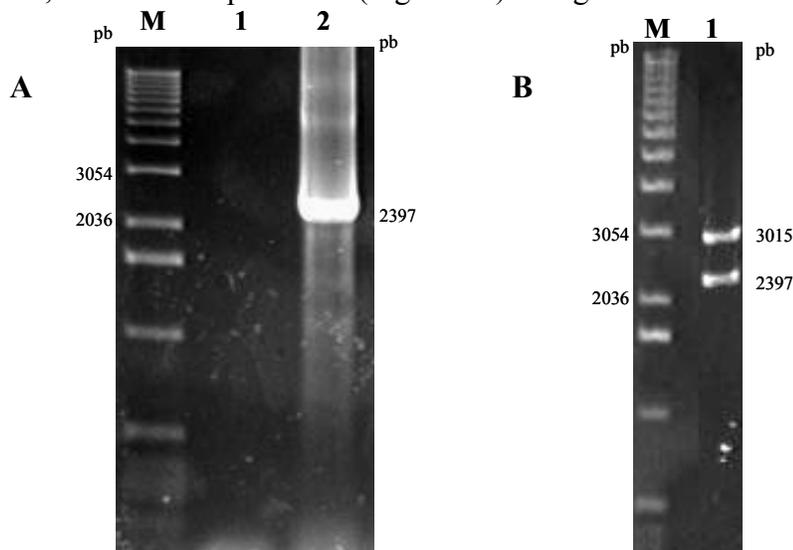


Figura 4.5 – Confirmação da clonagem do cassete gênico Promotor+*cry11a*. Eletroforese em géis de agarose a 0,8%. A: Confirmação da clonagem por PCR, com M, marcador de massa molecular 1Kb DNA ladder da Invitrogen; 1, controle negativo e 2, produto de amplificação correspondente à região promotora + gene *cry11a*; B: Confirmação da clonagem por digestão com M, marcador de massa molecular 1Kb DNA ladder da Invitrogen; 1, Digestão do plasmídeo pGP11a com *Bam*HI.

A região correspondente ao cassete Promotor + gene *cry11a*, foi então clonada no plasmídeo pHT315 e transformado em *E. coli* DH5- α , gerando o plasmídeo pHTP*cry11a* de 9.897 pb. A clonagem foi confirmada por PCR e digestão com a enzima *Bam*H I (Fig. 4.6 A e B). O seqüenciamento confirmou a identidade dos genes após os processos de clonagem.

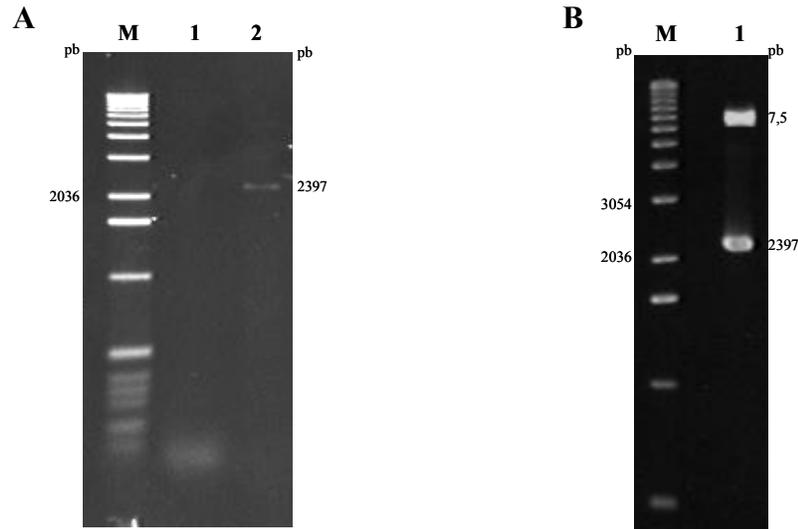


Figura 4.6 – Confirmação da transformação do plasmídeo pHTP*cry11a* em *E. coli*. A) Eletroforese em gel de agarose a 0,8%, mostrando a amplificação por PCR do cassete Promotor+*cry11a* (poço 1); M, marcador de massa molecular 1Kb DNA ladder da Invitrogen; 1, controle negativo; B) Eletroforese em gel de agarose mostrando a confirmação da clonagem do cassete Promotor+*cry11a* por digestão. M, marcador de massa molecular 1Kb DNA ladder da Invitrogen; 1, Digestão do plasmídeo pGP11a com *Bam*HI.

A confirmação da transformação do plasmídeo pHTP*cry11a* em *B. thuringiensis* se deu através de PCR (Fig. 4.7)

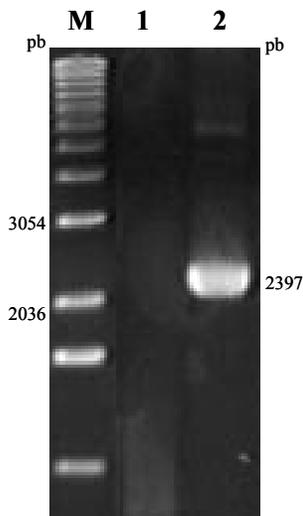


Figura 4.7 – Confirmação da transformação do plasmídeo pHTP*cry11a* em *B. thuringiensis*. Eletroforese em gel de agarose 0,8% mostrando em M, arcador de massa molecular 1Kb DNA ladder da Invitrogen; 1, controle negativo e 2, produto de amplificação correspondente à região promotora + gene *cry11a*.

3.2 – Construção do plasmídeo pSVPcry10A

O gene *cry10* (2.100 pb) clonado no plasmídeo pGemcry10A foi digerido com as enzimas *SpHI* e *Sall* (Fig. 4.8A) e o fragmento de DNA foi clonado no vetor pSVP27A (5.601 pb), previamente digerido com as mesmas enzimas (dado não mostrado), gerando o plasmídeo recombinante pSVPcry10A, que foi confirmado por digestão com as enzimas *SpHI* e *Sall* (Fig.4.8B) e PCR (Fig 4.8C) usando os oligonucleotídeos *cry10Fw* e *cry10R*. O seqüenciamento confirmou a identidade do gene após os processos de clonagem.

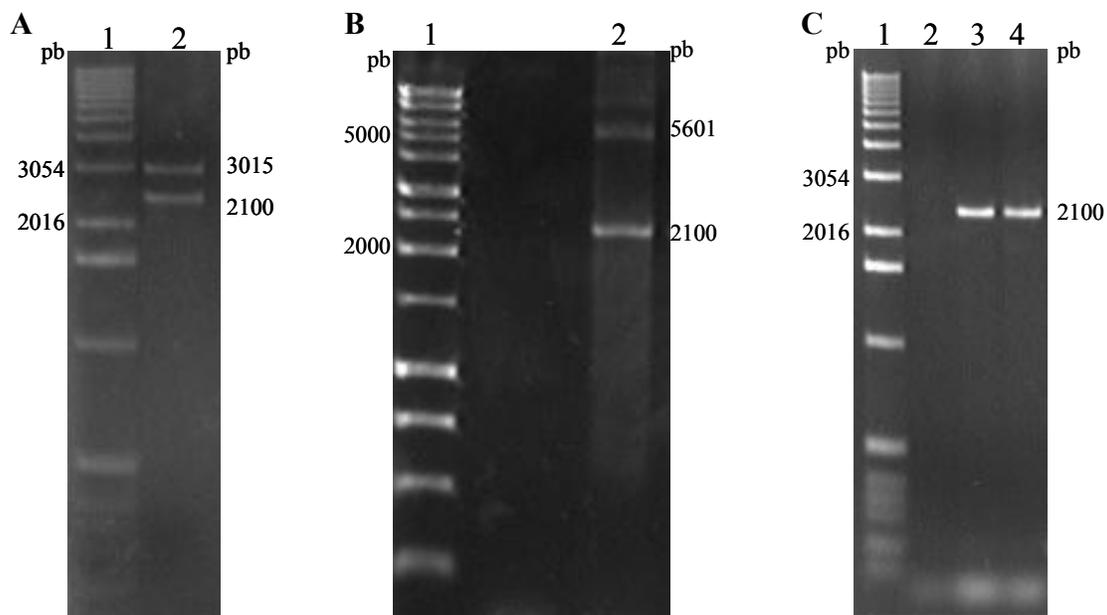


Figura 4.8: Construção do plasmídeo pSVPcry10A. Eletroforese em géis de agarose a 1,0% mostrando em A) Digestão do plasmídeo pGemcry10A clonado em *E. coli* com as enzimas *SpHI* e *Sall*, em 1, marcador de massa molecular 1Kb DNA ladder da Invitrogen, 2 – produto da digestão com as enzimas *SpHI* e *Sall*; B) Confirmação da clonagem do gene *cry10A* no vetor pSVP27A por digestão. Em 1, marcador de massa molecular 1Kb DNA ladder da Promega; 2, digestão do plasmídeo pSVP10 com as enzimas *SpHI* e *Sall*; C), Confirmação da clonagem do gene *cry10A* no vetor pSVP27 por PCR. Em 1, marcador de massa molecular 1Kb DNA ladder da Invitrogen, 2 – controle negativo, 3 – controle positivo (pGemcry10A) e 4 – pSVPcry10A.

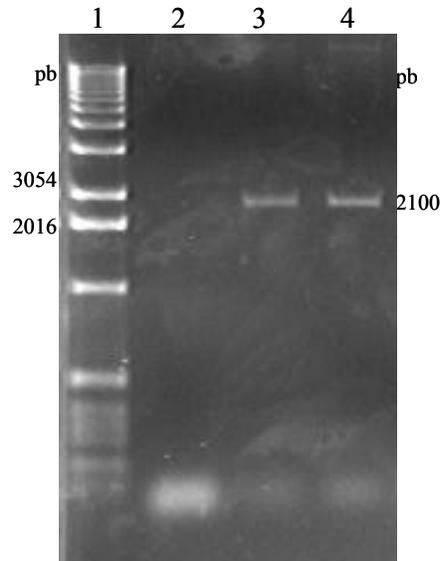


Figura 4.9: Confirmação da clonagem do plasmídeo pSVPcry10A em *B. thuringiensis*. Eletroforese em gel de agarose a 1,0% mostrando em 1, marcador 1Kb DNA ladder da Invitrogen; 2, controle negativo; 3, controle positivo (pGemcry10A) e 4, pSVPcry10A.

3.3 – Análise da expressão da proteína Cry1Ia expressa em *B. thuringiensis*

A proteína Cry1Ia expressa em Bt pode ser visualizada como um polipeptídeo de 75 kDa (Fig. 4.10A). A imunodeteção com anticorpo específico confirmou que a proteína expressa pelo Bt modificado, realmente se tratava da proteína Cry1Ia (Fig. 4.10B).

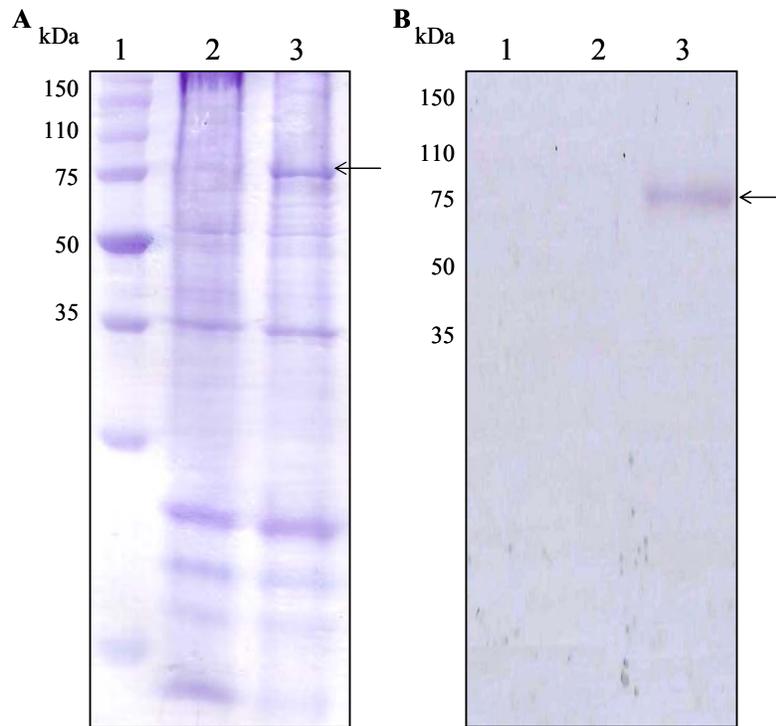


Figura 4.10 – Análise da expressão da proteína Cry1Ia; Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida a 12%, mostrando em A, Gel corado com coomassie blue; 1, marcador de massa molecular Rainbow da GE; 2, Bt Cry⁻ e 3, Bt expressando a proteína Cry1Ia; B – Westernblot anti-soro anti-Cry1Ia (Martins *et al.*, 2008); 1, marcador de massa molecular Rainbow da GE; 2, Bt Cry⁻ e 3, Bt expressando a proteína Cry1Ia. Setas indicam a presença da proteína Cry1Ia.

A proteína Cry10A expressa em Bt pode ser visualizada como um polipeptídeo de 78 kDa (Fig. 4.11A). A imunodeteção com anticorpo específico confirmou que a proteína expressa pelo Bt modificado, realmente se tratava da proteína Cry10 (Fig. 4.11B).

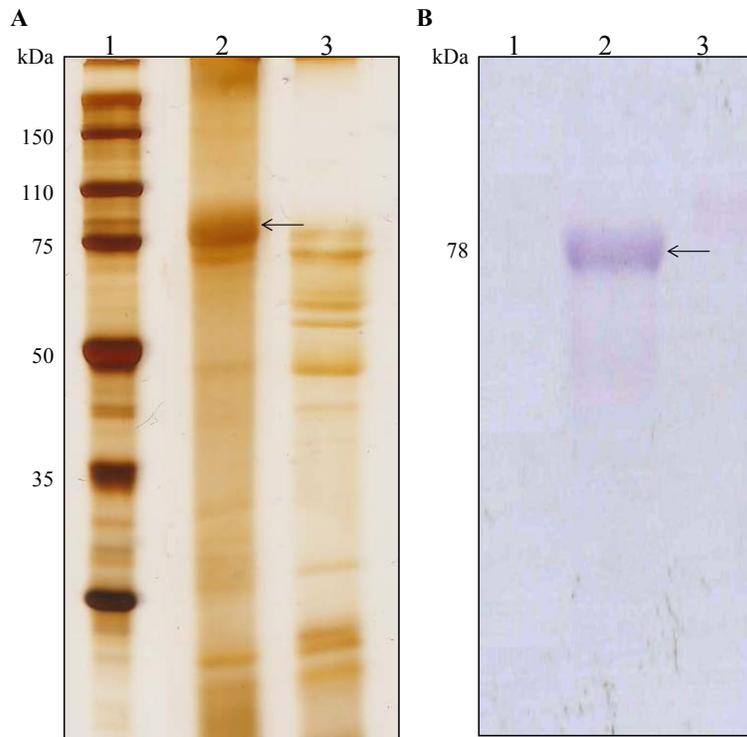


Figura 4.11 – Análise da expressão da proteína Cry10A. Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida a 12%, mostrando em A) Gel corado com prata; 1, marcador de massa molecular Rainbow da GE; 2, Bt expressando a proteína Cry10A e 3, Bt Cry⁻; B) Westernblot com anti-soro anti-Cry10A (Aguiar *et al.*, 2007) usando um membrana com as proteínas de um gel como descrito em A.1, marcador de massa molecular Rainbow da GE; 2, Bt expressando a proteína Cry10A 3, Bt Cry⁻. Setas indicam a presença da proteína Cry10A.

3.4 – Bioensaio com a proteína recombinante

A proteína Cry10A demonstrou ser a mais tóxica para *A. grandis*, apresentando uma CL₅₀ de 12,44 µg.mL⁻¹ (Tab 4.1) do que a Cry1I, mas não apresentou atividade a *S. frugiperda* (Tab. 4.2), como já era esperado.

O bioensaio com a proteína Cry1Ia recombinante expressa em Bt mostrou uma CL₅₀ de 22,14 µg.mL⁻¹ para *A. grandis* (Tab. 4.1), semelhante à obtida com a proteína expressa em sistema baculovírus/células de inseto, descrita por Martins *et al.* (2008), que foi de 21,5 µg.mL⁻¹, indicando ser esta proteína tóxica para o bicudo do algodoeiro.

Tabela 4.1 – Resultado de bioensaios contra *A. grandis* utilizando as proteínas Cry1Ia e Cry10 recombinantes expressas em Bt.

Amostra	n	CL50 ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) ^a
Cry1Ia	25	22,14 (17,5 – 25,2) ^b
Cry10A	25	12,44 (7,2 – 15,6)
<i>B. thuringiensis tenebrionis</i> (S1122)	25	380,8 (230,0 – 440,0)
S811	25	526,2 (238,3 – 845,6)

^a – Os resultados são expressos como a média em três experimentos independentes.

^b – os números entre parêntesis correspondem ao intervalo de confiança a 95%.

O bioensaio com a proteína Cry1Ia recombinante expressa em Bt mostrou uma CL₅₀ de 0,58 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para *S. frugiperda* (Tab. 4.2), semelhante à obtida por Martins *et al.* (2008), usando esta proteína expressa em sistema baculovírus/células de inseto, e estatisticamente semelhante à estirpe padrão *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1.

Tabela 4.2 – Resultado de bioensaios contra *S. frugiperda* utilizando as proteínas Cry1Ia e Cry10 expressas em Bt.

Amostra	n	CL50 ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) ^a
Cry1I	24	0,58 (0,198 – 0,823) ^b
Cry10	24	> 1000,00
<i>B. thuringiensis kurstaki</i> (HD-1)(S1450)	24	3,648 (0,511 – 15,9)

^a – Os resultados são expressos como a média \pm SD em três experimentos independentes.

^b – os números entre parêntesis correspondem ao intervalo de confiança a 95%.

3.5 – Microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura revelou a presença de cristais esféricos e rombóides para a proteína Cry1Ia e esféricos para proteína Cry10A (Fig. 4.12), diferentes dos cristais cubóides, observados, quando expressos em células de inseto usando baculovírus recombinantes contendo além do gene de interesse, o gene da poliedrina

(Martins *et al.*, 2008 e Aguiar, 2007), mas semelhantes aos encontrados quando este mesmo gene (*cry1Ia*) foi expresso usando baculovírus recombinantes sem o gene da poliedrina (dados não mostrados), e pelas estirpes selvagens que expressam estes genes.

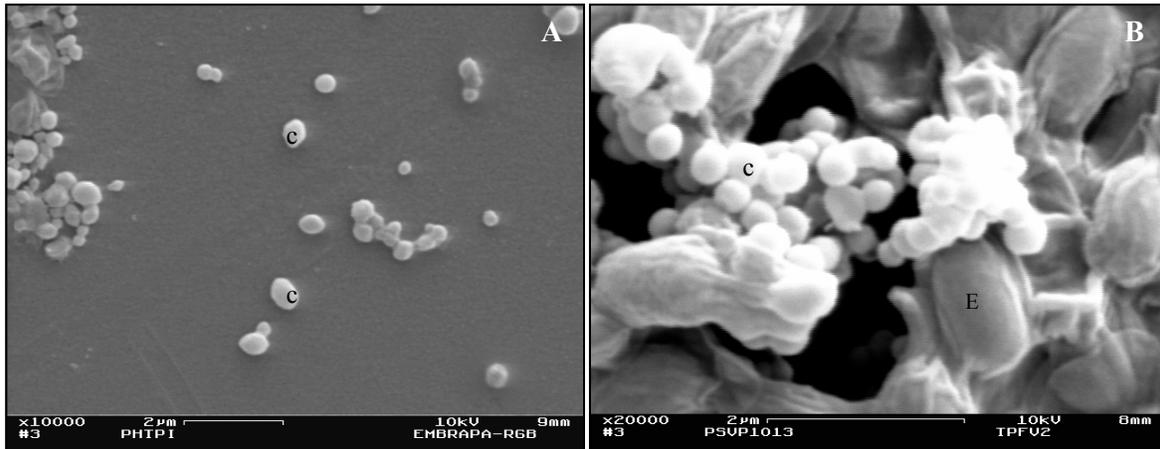


Figura 4.12: Morfologia dos cristais de proteínas expressas em Bt. Mostrando em A – micrografia eletrônica de varredura dos cristais da proteína Cry1Ia, B - micrografia eletrônica de varredura dos cristais da proteína Cry10A. E, esporos e C, cristais.

3.6 – Ensaio de ligação de proteínas Cry recombinantes a BBMV de *A. grandis* e *S. frugiperda*

Como foi observado anteriormente que a mesma proteína expressa em sistemas distintos apresentavam atividades semelhantes, mas morfologias diferentes dos cristais, os ensaios de ligação foram realizados com as proteínas expressas em sistema baculovírus/células de inseto (Fig. 4.13) e em sistema Bt (Fig. 4.14), a fim de se comparar se elas apresentariam o mesmo padrão de ligação.

As proteínas biotinizadas submetidas a SDS-PAGE foram visualizadas em gel corado com Azul de Cpmassie a 0,1% (Fig.4.13A e 4.14A) e em auto-radiografia para confirmar a biotinilação (Fig. 4.13B e 4.14B).

Os géis revelaram que os polipeptídeos correspondentes às proteínas Cry1Ia (produzida pelo vírus vSynCry1Ia), Cry10A (produzida pelo vírus vSynCry10), Poliedrina (produzida pelo vírus AcMNPV) (Fig.4.13B) e Cry1Ia (produzida pelo BtCry1Ia) e Cry10A (produzida pelo BtCry10A) (Fig.4.14B), foram devidamente biotinizadas

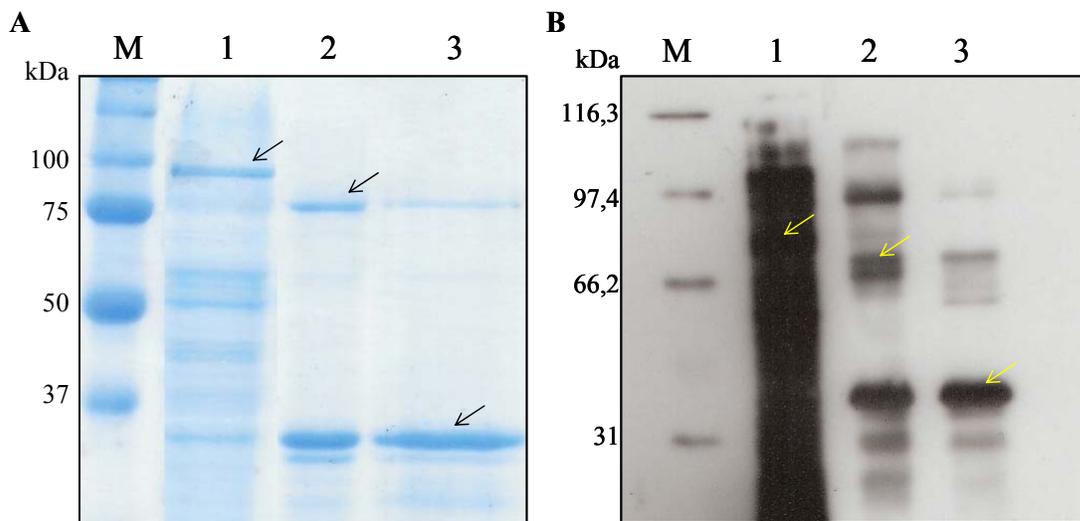


Figura 4.13 – Biotinilação das proteínas Cry1Ia, Cry10 e Poliedrina expressas em baculovírus. A: SDS-PAGE a 12% corado com coomassie-blue (M, marcador de massa molecular Precision Plus Protein™ All Blue Standards (BioRad); 1, Proteína Cry1Ia produzida em células de inseto infectadas pelo vSynCry1Ia, 2, Proteína Cry10A produzida em células de inseto infectadas pelo vSynCry10A, 3, Proteína poliedrina do AcMNPV) e B) Auto-radiografia das mesmas proteínas mostradas em (A), biotiniladas. Cry1Ia (1), Cry10A (2) e Poliedrina (3) (M, marcador de massa molecular Precision Plus Protein™ All Blue Standards (BioRad)). As seta indicam as bandas correspondentes às proteínas Cry1Ia, Cry10A e Poliedrina.

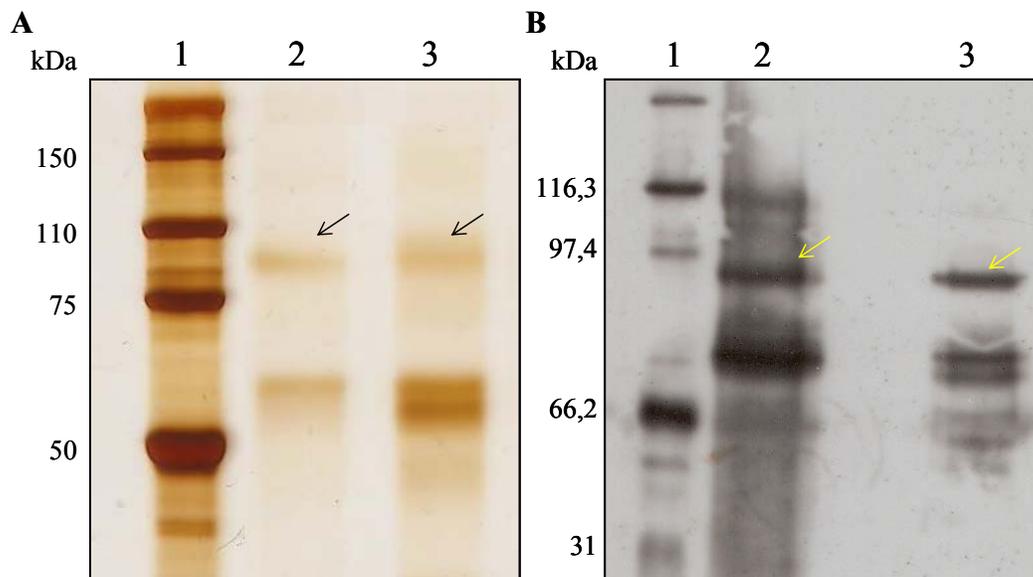


Figura 4.14 – Biotinilação das proteínas Cry1Ia e Cry10A expressas em Bt. A: SDS-PAGE a 12% corado com prata mostrando em 1, marcador de massa molecular Rainbow (Ge); 2, Proteína Cry1Ia; 3, Proteína Cry10A. B) Auto-radiografia das proteínas Cry1Ia e Cry10A biotiniladas mostrando em 1, marcador de massa molecular biotinilado Biotinylated High range –BioRad; 2, Cry10A e , 3,Cry1Ia. As setas indicam a posição das proteínas Cry1Ia e Cry10)

A membrana contendo as BBMV's de *A. grandis* e *S. frugiperda*, submetida à marcação com as proteínas biotiniladas apresentou ligação para as proteínas Cry1Ia e Cry10A [expressas em células de insetos (Fig. 4.15) e expressas em Bt (Fig. 4.16)]

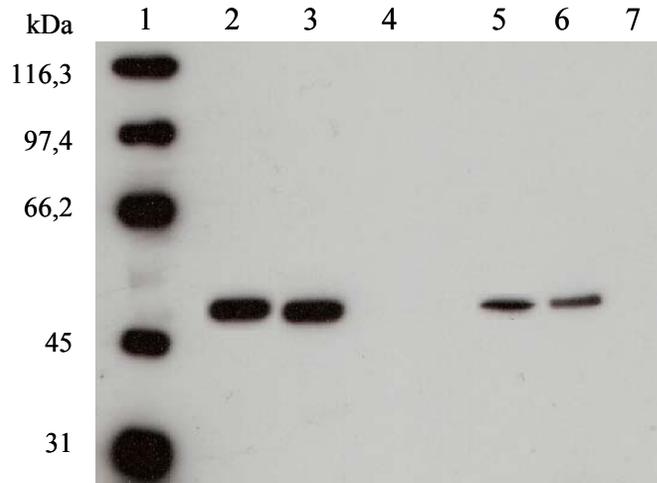


Figura 4.15 – Ensaio de ligação à BBMV's de *A. grandis* e *S. frugiperda* com proteínas derivadas de células de inseto infectadas por baculovírus. Autoradiografia mostrando em 1, marcador de massa molecular Biotinylated High range (BioRad), 2 a 4, BBMV's de *A. grandis* incubadas com as proteínas recombinantes derivadas de células de inseto infectadas com baculovirus recombinantes [Cry1Ia (2), Cry10A (3), Poliedrina (4)]. 5 a 7, BBMV's de *S. frugiperda* incubadas com as proteínas derivadas de células de inseto infectadas com baculovirus recombinantes [Cry1Ia (5), Cry10A (6), Poliedrina (7)].

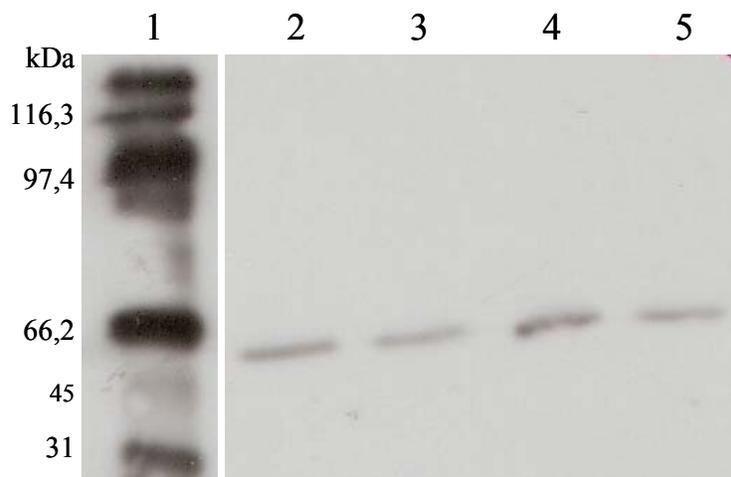


Figura 4.16 – Ensaio de ligação à BBMV's de *A. grandis* e *S. frugiperda* com proteínas derivadas de *B. thuringiensis*. Autoradiografia mostrando em 1, marcador de massa molecular Biotinylated High range (BioRad), 2 e 3, BBMV's de *A. grandis* incubadas com as proteínas recombinantes derivadas de *B. thuringiensis* [Cry1Ia (2), Cry10A (3)]. 4 e 5, BBMV's de *S. frugiperda* incubadas com as proteínas derivadas de células de inseto infectadas com baculovirus recombinantes [Cry1Ia (4), Cry10A (5)].

4. Discussão

Neste trabalho, as proteínas codificadas pelos genes *cry1Ia* e *cry10A* foram expressas em sistema Bt e analisadas quanto à toxicidade e ligação às proteínas do intestino de *A. grandis* e *S. frugiperda*. Além disso, essas proteínas foram comparadas com as mesmas proteínas expressas em células de inseto por baculovírus recombinantes (Martins *et al.*, 2008 e Aguiar, 2007).

A proteína Cry1Ia normalmente não se cristaliza, pois se trata de uma proteína que é secretada. Kostichka *et al.* (1996), demonstraram em seus trabalhos que esta é uma proteína secretada na fase inicial da esporulação e que possui uma região que pode funcionar como um peptídeo sinal para *Bacillus*, que se localiza no domínio N-terminal. Esse domínio é composto por uma região formada por aminoácidos carregados positivamente (M-1 a Q-10), uma região formada por resíduos hidrofóbicos (S-11 a A-16) e uma região polar (K-17). Por isso, não pode ser acumulada nem detectada na célula após o estágio T5 da esporulação (Tounsi e Jaoua, 2002; Tounsi *et al.*, 2003; Chang *et al.*, 2003).

Em algumas estirpes de *B. thuringiensis*, o gene *cry1Ia* pode ser detectado por PCR, mas nem seu transcrito, nem a proteína são detectados. Alguns estudos demonstraram que este gene pode ser silenciado em algumas estirpes de *B. thuringiensis*, por estarem localizados a jusante de genes *cryI* e sob a influência de um forte terminador transcricional que está presente no intervalo de sequências dos genes *cryI* e *cryII* (Song *et al.*, 2003; Shin *et al.*, 1995; Gleave *et al.*, 1993; Taylor *et al.*, 1992).

Quando expresso, o gene *cry1Ia* codifica uma proteína de 81 kDa, em *B. thuringiensis*. Essa proteína é uma protoxina, que é clivada em uma toxina ativa de 65 kDa, capaz de se ligar a receptores do epitélio do intestino médio de insetos das ordens Lepidoptera e Coleoptera (Taylor *et al.*, 1992; Gleave *et al.*, 1993; Tounsi *et al.*, 2003).

Em um trabalho anterior, nosso grupo demonstrou que a proteína Cry1Ia expressa em células de inseto, usando um baculovírus recombinante, foi capaz de formar cristais cubóides, e com toxicidade para *A. grandis* e *S. frugiperda* (Martins *et al.*, 2008). A proteína cristal produzida em larvas de inseto, pelo vírus recombinante vSynCry1Ia foi detectada por SDS-PAGE como um polipeptídeo de 65 kDa, indicando que enzimas do próprio inseto poderiam estar clivando a proteína e, por isso, somente o polipeptídeo

correspondente à toxina ativa foi detectado (Choi *et al.*, 2000; Shin *et al.*, 1995; Gleave *et al.*, 1993).

Neste trabalho, obtivemos para a proteína Cry1Ia, um polipeptídeo de 75 kDa, menor que o esperado para esta proteína, porém o ensaio imunológico com o mesmo anti-soro usado no trabalho de Martins *et al.* (2008), apresentou marcação específica para este polipeptídeo, confirmando se tratar da mesma proteína em questão. Provavelmente, esta proteína pode ter sofrido algum processamento proteolítico durante a preparação levando a detecção de um fragmento relativamente menor, porém com atividade tóxica semelhante à já descrita.

A proteína recombinante Cry1Ia foi testada contra larvas neonatas de *A. grandis* e mostrou uma CL_{50} de $22,14 \mu\text{g.mL}^{-1}$, estatisticamente semelhante à obtida por Martins *et al.* (2008), que foi de $21,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ mostrando não haver diferença de toxicidade entre as proteínas expressas em Bt e células de inseto. Quando foi administrado a mesma quantidade de proteína recombinante e proteína cristal total da estirpe padrão de *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* (Btt), a atividade tóxica da proteína recombinante foi cerca de dezessete vezes maior. Os ensaios com a estirpe padrão e com a estirpe S811 foram feitos com cultura total, uma vez que, em estirpes de Bt, a proteína Cry1Ia não se cristaliza (Espinasse *et al.*, 2003), sendo então secretada no meio de cultura. Desta forma, se os cristais fossem purificados, provavelmente se perderia a fração da cultura que contém a proteína de interesse. Além disso, a proteína Cry1Ia também apresentou alta toxicidade para larvas de *S. frugiperda* com uma CL_{50} de $0,58 \mu\text{g.mL}^{-1}$, estatisticamente semelhante à estirpe padrão HD-1. Estes resultados confirmam a hipótese desta proteína ser promissora para o controle do bicudo do algodoeiro, podendo futuramente ter seu gene inserido em cultivares de algodão para o controle desta praga.

Já existe um grupo do Centro Nacional de Pesquisa do Algodão da Embrapa, que inseriu este gene em uma cultivar de algodão, e os resultados preliminares já indicaram que os níveis de expressão da toxina Cry1Ia em algodão foram suficientes para matar 85% de larvas de *S. frugiperda* alimentadas com folhas de algodão transformado.

Aguiar (2007) expressou, em células de inseto, a proteína codificada pelo gene *cry10A*, que resulta em uma pró-toxina de 78 kDa e, quando processada por proteases, é clivada em uma toxina ativa de 60 kDa tóxica para insetos da ordem Diptera. A proteína recombinante Cry10Aa produzida pelo baculovírus recombinante vSyncry10Aa em extratos de células de *T. ni* (BTI-TN5B1-4) infectadas, foi detectada por SDS-PAGE a 12% como um polipeptídeo de aproximadamente de 74 kDa. Durante a infecção das células BTI-TN5B1-4 pelo recombinante vSyncry10Aa foi possível observar a presença de cristais cubóides no citoplasma das células infectadas.

A proteína Cry10Aa foi primeiramente descrita na literatura como proteína com atividade tóxica para insetos da ordem Diptera. Isso se deveu, principalmente, por ser encontrada na estirpe de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, que possui várias proteínas com atividade tóxica para diversos insetos da ordem Diptera, entre elas as proteínas Cry4Aa, Cry4Ba, Cry10Aa, Cry11Aa, Cyt1Aa e Cyt2Ba (Ben-Dov *et al.*, 1999; Guerchicoff *et al.*, 1997; Berry *et al.*, 2002).

Diversos insetos da ordem Coleoptera possuem suscetibilidade às proteínas Cry de Bt, tais como: *Chrysomela scripta* e *Anthonomus grandis* (Tailor *et al.*, 1992; Martins *et al.*, 2008), *Leptinotarsa texana* (Martínez, 2004), *Leptinotarsa decemlineata* (Martínez, 2004), *Tenebrio molitor* e *Tribolium castaneum* (Martínez, 2004), *Diabrotica undecimpunctata* (Martínez, 2004), *Ephilachna varivestis* (Martínez, 2004), *Phaedon brassicae* e *Anomala cuprea* (Martínez, 2004).

Aguiar (2007), obteve para a proteína Cry10Aa, uma CL₅₀ de 7,12 µg.mL⁻¹ para *A. grandis*, a mais baixa já descrita para este inseto, uma vez que a proteína Cry11a descrita por Martins *et al.* (2008) possui uma CL₅₀ de 21,5 µg.mL⁻¹, quase três vezes maior, e a para a estirpe S1806, da qual o gene *cry10*, foi clonado a CL₅₀ foi de de 300 µg.mL⁻¹ (Martins *et al.*, 2006), 42 vezes maior que da proteína recombinante.

Neste trabalho, obtivemos para a proteína Cry10A uma CL₅₀ de 12,44 µg.mL⁻¹ para *A. grandis* estatisticamente semelhante à obtida por Aguiar *et al.* (2007), confirmando a atividade desta proteína, porém com já se era esperado, no ensaio contra *S. frugiperda*, a atividade desta proteína não foi detectada. Apesar da proteína Cry10A não ter atividade tóxica significativa contra *S. frugiperda*, nos ensaios de ligação foi possível verificar a interação desta toxina com BBMV's deste inseto. A cinética de união das toxinas Cry às

vesículas da membrana das microvilosidades apicais dos insetos suscetíveis é bifásica, composta de um passo reversível e outro irreversível (Hoffman *et al.*, 1988; Van Rie *et al.*, 1989). O primeiro passo envolve a interação entre a toxina e seu sítio de união (união reversível), que é um requisito básico para que ocorra toxicidade, mas não suficiente (Schnepf *et al.*, 1998). É possível que, a toxina Cry10A seja capaz de se ligar inicialmente às BBMV's de *S. frugiperda*, mas somente esta ligação inicial não seria suficiente para provocar a morte do inseto. Bravo *et al.* (2007), propuseram um modo de ação no qual um segundo receptor está envolvido, talvez seja aí a barreira física para ação desta toxina para este inseto.

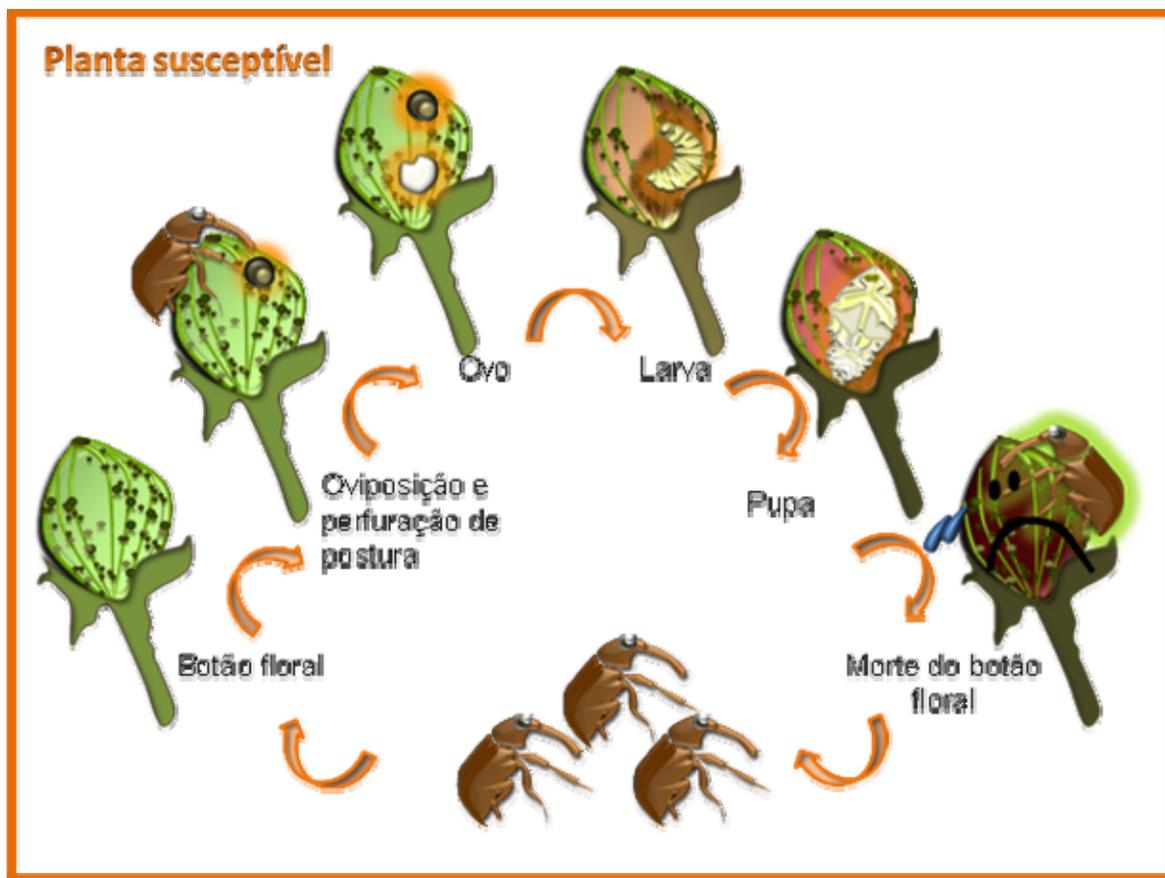
A caracterização morfológica dos cristais das proteínas Cry1Ia (rombóide e esféricos) e Cry10A (esféricos), expressas em Bt, revelaram diferenças significativas, das obtidas quando estas foram expressas em células de inseto, apresentando formato cubóide. Estes resultados indicam que cristais de forma cubóide podem estar relacionados à estrutura da poliedrina, uma vez que é comum visualizar esta morfologia quando diferentes genes de Bt são expressos em células de inseto infectadas por baculovírus recombinantes contendo, além do gene de interesse, o gene da poliedrina (Aguiar *et al.*, 2007, Martins *et al.*, 2008 e Corrêa, 2007).

Os ensaios de ligação mostraram que há interação entre as proteínas Cry1Ia e Cry10A expressas em Bt e células de inseto com as proteínas receptoras na membrana apical do intestino médio destes insetos. Em células de inseto, a proteína viral poliedrina é também expressa e é co-purificada com as proteínas recombinantes Cry1Ia e Cry10A, porém a não ligação da mesma aos receptores destes insetos indica que, apesar desta proteína poder participar do processo de dobramento e formação do cristal (dados não mostrados), a mesma não possui influência no processo de reconhecimento e ligação de proteínas Cry aos receptores presentes nas BBMV's de *A. grandis* e *S. frugiperda*.

Outros ensaios deverão ser realizados a fim de se determinar a especificidade desta ligação e a natureza destes receptores.

Levando em consideração o estado atual do conhecimento sobre o modo de ação de toxinas Cry sobre as diferentes ordens de insetos e os resultados obtidos neste trabalho, demonstramos que o modo de ação para coleópteros possui algumas semelhanças ao proposto para lepidópteros, descrito por Bravo *et al*, 2007. No qual, no intestino médio da larva os cristais são solubilizados e ativados em proteínas que se ligam a uma proteína receptora (ALP-GPI), levando à inserção na plataforma de lipídeos da membrana e formação do poro, provocando a morte do inseto.

No caso de controle de *A. grandis*, estas seriam usadas em plantas transformadas, resistentes a insetos-praga (Fig. 5.1).



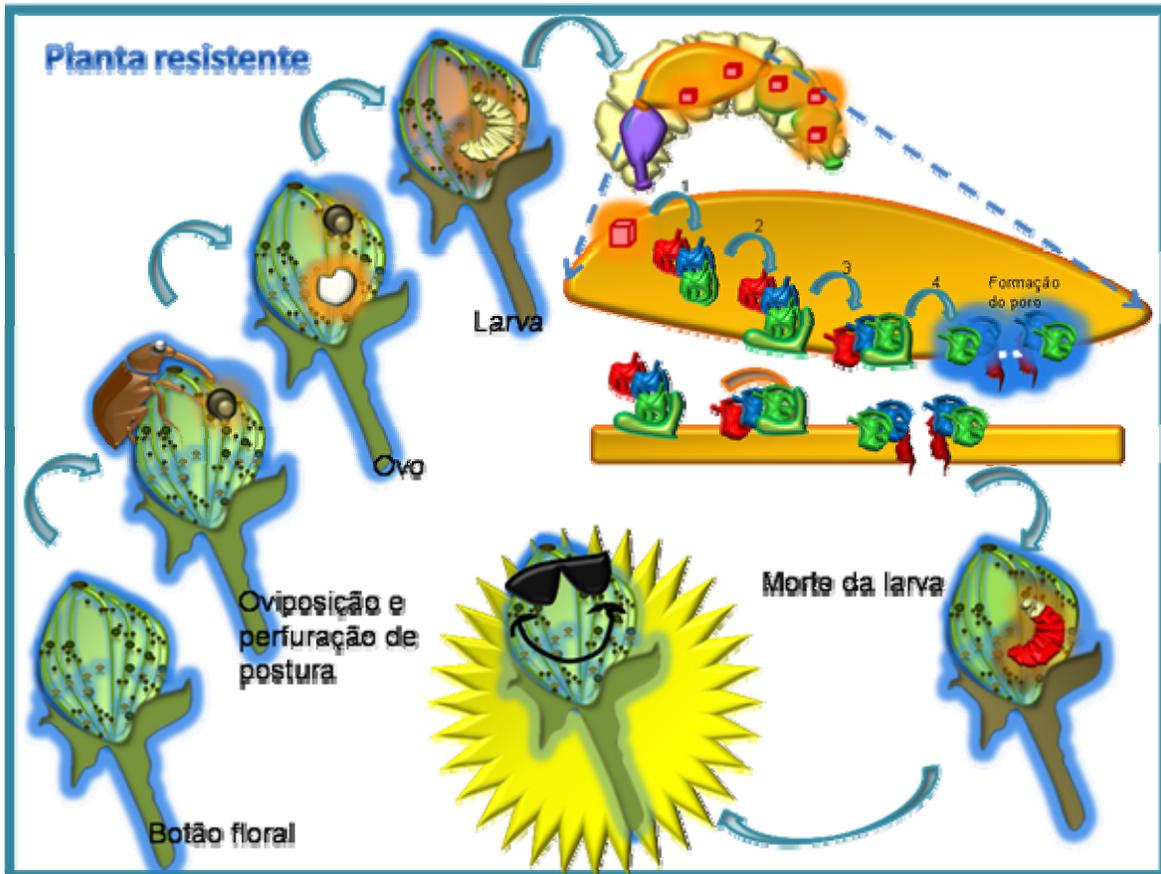


Figura 5.1 – Esquema da atividade de proteínas Cry expressas em plantas de algodão. A: Planta não resistente é atacada pelo inseto, que se desenvolve debilitando a planta podendo levá-la à morte; B: O inseto faz a oviposição na planta que expressa a toxina, quando a larva ingere o tecido contendo a toxina, esta se liga a receptores específicos, levando à morte do inseto, permitindo que a planta se desenvolva normalmente. Ilustração feita por Maria Creuza Barros, laboratório de Microscopia Eletrônica – UnB.

PERSPECTIVAS FUTURAS

- Determinar a sequência do receptor da proteína Cry1Ba de *B. thuringiensis* em *A. grandis*;
- Realizar ensaios de competição heteróloga entre as proteínas Cry1B, Cry1Ia e Cry10 usando vesículas de *A. grandis* e *S. frugiperda* para verificar se a proteína receptora para estas toxinas é a mesma ou não;
- Identificar a proteína receptora para as proteínas Cry1Ia e Cry10 de *B. thuringiensis* em *A. grandis*;
- Identificar a proteína receptora para a proteína Cry1Ia de *B. thuringiensis* em *S. frugiperda*;
- Realizar estudos de proteômica de BBMV's de *A. grandis* e *S. frugiperda*;
- Entender o mecanismo de ação de proteínas Cry em insetos coleópteros.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

Abad, A.R., Duck, N.B., Feng, X., Flannagan, R.D., Kahn, T.W., Sims, L.E., 2001. Genes encoding novel proteins with pesticidal activity against coleopterans. Patent: WO 0234774-A 02-MAY-2001; E.I. Du Pont De Nemours and company (US).

Abdullah, M.A.F, Valaitis, A.P, Dean, D.H. 2006. Identification of a *Bacillus thuringiensis* Cry11Ba toxin-binding amino-peptidase from the mosquito, *Anopheles quadrimaculatus*. *BMC Biochem.* 7(16), 1-6..

Adams, L.F., Brown, K.L., Whiteley, H.R. 1991. Molecular cloning and characterization of two genes encoding sigma factors that direct transcription from a *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene promoter. *J. Bacteriol.* 173, 3846-3854.

Adang, M.J., Staver, M.J., Rocheleau, T.A., Leighton, J., Barker R.F., Thompson, D.V. 1985. Characterized full-length and truncated plasmid clones of the crystal protein of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 and their toxicity to *Manduca sexta*. *Gene*: 36(3):289-300.

Agaisse, H. Lereclus, D. 1994b. Expression in *Bacillus subtilis* of the *Bacillus thuringiensis* cryIIIa toxin gene is not dependent on a sporulation-specific sigma factor and is increased in spoA mutant. *J. Bacteriol.* 176, 4734-4741.

Agaisse, H., Lereclus, D. 1994a. Structural and functional analysis of the promoter region involved in full expression of the cryIIIa toxin gene of *Bacillus thuringiensis*. *Mol. Microbiol.* 13, 97-107.

Agaisse, H., Lereclus, D. 1995. How does *Bacillus thuringiensis* produces so much insecticidal crystal protein. *J. Bacteriol.* 177, 6027-6032.

Aguiar, R.W.S. 2007. **Estudo da toxicidade de proteínas Cry recombinantes de *Bacillus thuringiensis*, utilizando o sistema de expressão baseado em baculovírus e células de inseto.** UnB, Brasília, 130 p. Tese Doutorado.

Altschul SF., Gish, W., Miller, W., Myers, EW., Lipman, DJ., 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 372-382.

Aronson, A.I., Beckman, W., Dunn, P. 1986. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. *Microbiol. Rev.* 50, 1-24.

Arrieta, G., Hernández, A., Espinoza, AM. 2004. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains isolated from coffee plantations infested with the coffee berry borer *Hypotenemus hampei*. *Rev. Biol. Trop.* 52(3), 757-764.

Assunção, P.E.F. 1987. Bicudo: esse perigo deve ser controlado. *Correio Agrícola*, São Paulo. 3, 16-18.

Ballaminut, C.E., Moreira, M.S., Almeida, R.E.M. 2006. **Fitotoxicidade, perdas na produção e qualidade na fibra.** ESALQ, Piracicaba, 14 p. Monografia.

Ballaminut, C.E., **Transgênicos.** Retirado de www.algodao.agr.br em 03/01/2007

Barbosa, S., Braga Sobrinho, R., Lukefahr, M. J., Bengola, O. G. 1983. Relatório sobre ocorrência do bicudo do algodoeiro, *Anthonomus grandis Boheman*, “Boll Weevil” no Brasil e recomendações para sua erradicação. Campina Grande: **EMBRAPA – CNPA**, 12p. (EMBRAPA – CNPA. Documentos, 21).

Barros, M.C.E.S. 2007. **Expressão de proteínas do vírus da Dengue em células de inseto utilizando o Sistema Baculovírus de Expressão.** UnB, Brasília, 108p. Dissertação Mestrado.

Baum, J.A., Malvar,T. 1995. Regulation of insecticidal crystal protein production in *Bacillus thuringiensis*. *Mol. Microbiol.* 18(1), 1-12.

Baum, JA., Chu, C., Rugar, M., Brown, G., Donovan, W., Huessing, J., Ilagan, O., Malvar, T., Pleau, M., Walters, M., Vaughn, T., 2004. Binary toxins from *Bacillus thuringiensis* active against the western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 4889–4898.

Baum, J.A., Light Mettus, A.M., 2000. Polypeptide compositions toxic to Diabrotica insects, obtained from *Bacillus thuringiensis*; CryET70, and methods of use. Patent: PCT WO/00/26378-B 11-MAY-2000. Monsanto Company; 700 ChesterWeld Parkway North, GG4C; Plant Protection; St. Louis, MO, USA.

Belfiore, C.J., Vadlamudi, R.K., Osman, Y.A., Bulla Jr., L.A., 1994. A specific binding protein from *Tenebrio molitor* for the insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Tenebrionis*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 200, 359-364.

Ben-Dov, E., Wang, O., Zaritsky, A., Manasherob, R., Barak, Z., Schneider, B., Khamraev, A., Baizhanov, M., Glupov, V., Margalith, Y. 1999. Multiplex PCR screening to detect *cry9* genes in *Bacillus thuringiensis* strains. **Appl. Environ. Microbiol.** 65(8), 3714-3716.

Berry, C., O'neil S., Ben-Dov, E., Jones, A.F., Murphy, L., Quail, M.A., Holden, M.T., Harris, D., Zaritsky, A., Parkhill, J. 2002. Complete sequence and organization of pBtoxis, the toxin-coding plasmid of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **Appl. Environ. Microbiol.** 68, 5082–5095.

Betchtel, D.B. And Bulla, L.A. 1976. Electron microscopic study of the sporulation and parasporal crystal formation in *Bacillus thuringiensis*. **J. Bacteriol.** 127, 1472-1481.

Bietlot *et al.*, 1990

Blum, H.; Beier, H., Gross, H.J. 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis.** 8,93-99.

Bohorova, N., Frutos, R., Royer, M., Estañol, P., Pacheco, M., Rascón, Q., McLean, S., Hoisington, D., 2001. Novel synthetic *Bacillus thuringiensis* fusion confer resistance to southwestern corn borer, sugarcane borer and fall armyworm in transgenic tropical maize. **Theor. Appl. Genet.** 103, 817-826.

Bourgouin, C., Delécluse, A., Ribier, J., Klier, A., Rapoport, G. A 1988. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* gene encoding a 125-kilodalton larvicidal polypeptide is associated with inverted repeat sequences. **J. Bacteriol.** 170, 3575-3583.

Bozzola, J.J., Russel, L.D., 1992. **Electron microscopy**: principles and techniques for biologists. Jones & Batlet, Boston. 542 p.

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254,

Bradley Junior, J.R., Phillips, J.R. 1978. Biology and population dynamics. In: Warren, L.O. **The boll weevil, management strategies**. Fayetteville, s. ed. (Bulletin, 228).

Bradley, D., Harkey, M. A., Kim, M.-K., Brever, D. and Bauer, L. S. 1995. The insecticidal Cry1B protein of *Bacillus thuringiensis* spp. *thuringiensis* has dual specificity to coleopteran and lepidopteran larvae. *J. Invertebr. Pathol* 65: 162-173.

Bravo, A., Gill, S.S., Soberón, M., 2007. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon* 49, 423-435.

Bravo, A., Gill, SS., Soberón, M., 2005. *Bacillus thuringiensis* mechanisms and use. In **Comprehensive Molecular Insect Science**. Gilbert, LI., Kostas, I., Gill, SS. (eds), Elsevier, pp 175-206 Vol 6.

Bravo, A., Gómez, I., Conde, J., Muñoz-Garay, C., Sánchez, J., Miranda, R., Zhuang, M., Gill, S., Soberón, M. 2004. Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. *Biochim. Biophys. Acta* 1667, 38–46.

Bravo, A., Hendrickx, K., Jansens, S., Peferoen, M. 1992. Immunocytochemical analyses of specific binding of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins to Lepidopteran and coleopteran midgut membranes. *J. Invertebr. Pathol.* 60, 247-253.

Bravo, A., Sarabia, S., Lopez, L., Ontiveros, H., Abarca, C., Ortiz, A., Ortiz, M., Lina, L., Villa-lobos, FJ., Guadalupe, P., Nunez-Valdez, ME., Soberón, M., Quintero, R., 1998. Characterization of *cry* genes in Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4965 – 4972.

- Breitler, J.C., Marfa, V., Royer, M., Meynard, D., Vassal, JM., Vercambre, B., Frutos, R., Messenger, J., Gabarra, R., Guiderdoni, E. 2000. Expression of *Bacillus thuringiensis cry1B* synthetic gene protects mediterranean rice against the striped stem borer. *Plant Cell Rep.* **19**, 1195-1202.
- Brizzard, B.L., Whiteley, H.R. 1988. Nucleotide sequence of an additional crystal protein gene cloned from *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis*. *Nucl. Acids. Res.* **16**, 2723–2724.
- Brown, K.L., Whiteley, H.R. 1988. Isolation of a *Bacillus thuringiensis* RNA polymerase capable of transcribing crystal protein genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 4166-4170.
- Brown, K.L., Whiteley, H.R. 1990. Isolation of the second *Bacillus thuringiensis* RNA polymerase that transcribes from a crystal protein gene promoter. *J. Bacteriol.* **172**, 6682-6688.
- Busoli, A.C., Soares, J.J., Lara, F.M., 1994. O bicudo do algodoeiro e seu manejo. **FUNEP**, Jaboticabal: 32 p. (Boletim, 5).
- Buzdin, A.A., Revina, L.P., Kostina, L.I., Zalunin, I.A., Chestukhina, G.G., 2002. Interaction of 65- and 62-kD proteins from the apical membranes of the *Aedes aegypti* larvae midgut epithelium with Cry4B and Cry11A endotoxins of *Bacillus thuringiensis*. *Biochemistry (Mosc)* **67**, 540–546
- Carvalho, E., Breda, C.E., Brugnera, P., Marchesan, S.A., Giongo, J.O., De Oliveira, J.C., Rosin, J.B., Dos Santos, V., Filho, A.C.De O., Degrande, P.E. 2001. Bloqueio populacional do bicudo do algodoeiro no oeste da Bahia. In: Congresso Brasileiro de Algodão, 3. Campo grande, MS. **Anais**. p. 134-137.
- Castro, L.A.B. 1992. Plantas transgenicas resistentes a insetos: perspectivas e limitações. *PAB*. **27**, 319-424.

Ceron, J., Covarrubias, L., Quintero, R., Ortiz, A., Ortiz, M., Aranda, E., Lina, L., Bravo, A. 1994. PCR analysis of the *cryI* insecticidal crystal family genes from *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 353-356.

Ceron, J.; Ortiz, A.; Quintero, R.; Guereca, L.; Bravo, A. 1995. Specific PCR primers directed to identify *cryI* and *cryIII* genes within a *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3826-3831.

Chang, C., Yu, Y.M., Dai, S.M., Law, S.K., Gill, S.S., 1993. High-level *cryIVD* and *cytA* gene expression in *Bacillus thuringiensis* does not require the 20-kilodalton protein, and coexpressed gene products are synergistic in their toxicity to mosquitoes. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 815 – 821.

Chang, J.H., Choi, J.Y., Jin, B.R., Roh, J.Y., Olszewski, A., Seo, S.J., O'reilly, D.R., Je, Y.H. 2003. An improved Baculovirus insecticida producing occlusion bodies that contain *Bacillus thuringiensis* insect toxin. *J. Invertebr. Pathol.* 84, 30-37.

Chen, J., Brown, M. R., Hua, G., Adang, M. J. 2005. Comparison of the localization of *Bacillus thuringiensis* Cry1A δ -endotoxin and their binding proteins in larval midgut of tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Cell. Tissue. Res.* 321, 123-129.

Choi, S. K., Shin, B. S., Kong, E. M., Rho, H. M. & Park, S. H. 2000. Cloning of a new *Bacillus thuringiensis cryII*-type crystal protein gene. *Curr. Microbiol.* 41, 65-69.

Corrêa, R.F.T. **Estudo da atividade tóxica para *Aedes aegypti* das proteínas Cry4Aa e Cry4Ba de *Bacillus thuringiensis* expressas em baculovírus recombinantes.** UnB, Brasília, 2007. 95p. Dissertação Mestrado.

Crickmore, N., Ellar, D., 1992. Involvement of a possible chaperonin in the efficient expression of a cloned CryIII A δ -endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*. *Mol. Microbiol.* 6(11), 1533 – 1537.

Crickmore, N., Nicholls, C., Earp, D.J., Hodgman, C., Ellar, D.J., 1990. The construction of *Bacillus thuringiensis* strains expressing novel entomocidal δ -endotoxin combinations. **Biochem. J.** 270, 133 – 136.

Crickmore, N., Zeigler, D.R., Feitelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Dean, D.H., 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. **Microbiol. Molec. Biol. Rev.** 62, 807–813.

Cruz, I., Figueiredo, M. de L.C., Matoso, M.J. 1999. Controle Biológico de *Spodoptera frugiperda* utilizando o parasitóide de ovos *Trichogramma*. Sete Lagoas: **Embrapa Milho e Sorgo**. 40p.

Dankocsik, C., Donovan, W. P., Iany, C. S. 1990. Activation of a cryptic crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* by gene fusion and determination of the crystal protein insecticidal specificity. **Mol. Microbiol.** 4 (12), 2087-2094.

De Maagd, R. A., Bravo, A., Crickmore, N. 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. **Trends. Genet.** 17(4), 193-199.

Denolf, P., Hendrickx, K., Vandamme, J., Jansens, S., Peferden, M., Degheele, D. And Van Rie, J. 1997. Cloning and characterization of *Manduca sexta* and *Plutella xylostela* midgut aminopeptidase N enzymes related to *Bacillus thuringiensis* toxin-binding proteins. **FEBS.** 248(3), 748-761.

De-Souza, M.T., Agaisse, H., Lereclus, D. 1993. High-level transcription of the *cryIII*A toxin gene of *Bacillus thuringiensis* depends on a second promoter located 600 pb upstream of the translational start site. **Braz. J. Genet.** 19(2), 197-203.

Donovan Wp, Dankocsik Cc, Gilbert Mp, Gawron-Burke Mc, Groat Rg, Carlton Bc. 1992. Amino acid sequence and entomocidal activity of the P2 crystal protein. An insect toxin from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. **J. Biol.Chem.** 263(1):561- 567.

Donovan, W. P., Dankocsik, C. C., Gilbert, M. P. 1988. Molecular characterization of a gene encoding a 72-kilodalton mosquito-toxic crystal protein from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **J.Bacteriol.** 170, 4732-4738.

Dos Santos, R. C. **Estudos biológicos e moleculares da colesterol oxidase visando o controle do bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis* Boheman, 1843)**. UNB, Brasília, 2003.

Espinasse, S., Chaufaux, J., Buisson, C., Perchat, S., Gohar, M., Bourguet, D., Sanchis, V. 2003. Occurrence and linkage between secreted insecticidal toxins in natural isolates of *Bacillus thuringiensis*. **Curr. Microbiol.** 47, 501-507.

Espinasse, S., Gohar, M., Chaufaux, J. Christophe, B., Perchat, S., Sanchis, V. 2002. Correspondence of High Levels of Beta-Exotoxin I and the Presence of *cry1B* in *Bacillus thuringiensis*. **Appl. Environ. Microbiol.** 68(9), 4182-4186.

Estruch, J.J., Warren, G.W., Mullins, M.A., Nye, G.J., Graig, J.A., Koziel, M.G. 1996. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 93, 5389-5394.

Farias, F.J.C. 2005. **Índice de seleção em cultivares de algodoeiro herbáceo**. ESALQ, Piracicaba, 122 p. Tese Doutorado.

Farkas, J., Sebesta, K., Horska, K., Samek, Z., Dolijis, J., Sorm, F. 1969. The structure of exotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *gelechiae*. **Collect. Czech. Chem. Commun.** 34, 1118-1120.

Faust, R.M., Bulla, A.L. Jr. 1982. Bacterial and their toxins as insecticides. In: **Kurstaki, E.**, ed. *Microb. and viral pest.*. New york: Marcel Dekker, p. 75-206, 1982.

Federici, B.A., Bauer, L.S., 1998. Cyt1Aa protein of *Bacillus thuringiensis* is toxic to the cottonwood leaf beetle, *Chrysomela scripta*, and suppresses high levels of resistance to Cry3Aa. **Appl. Environ. Microbiol.** 64, 4368-4371.

Feitelson, J. S.; Payne, J and Kim, L. 1992. *Bacillus thuringiensis* insects and beyond. **Biotechnol.** 10, 271-275.

Feitelson, J.S. 1994. Novel pesticidal delta-endotoxins from *Bacillus thuringiensis*. In: **Proceedings of XXVII Annual Meeting of the Society For Invertebrate Pathology**, p.184. Montpellier, France.

Fernández, LE., Aimanova, KG., Gill, SS., Bravo, A., Soberón, M., 2006. A GPI-anchored alkaline phosphatase is a functional midgut receptor of Cry11Aa toxin in *Aedes aegypti* larvae. **Biochem. J.** 394, 77–84.

Fernández, LE., Gómez, I., Pacheco, S., Arenas, I., Gill, SS., Bravo, A., Soberón, M. 2008. Employing phage display to study the mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins. **Peptides** 29, 324–329.

Ferré, J., van Rie, J., 2002. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annu. Rev. Entomol.** 47, 501–533.

Finney, D. Probit analysis. **Cambridge University Press**, Cambridge, pag. 50-80, 1971.

Fournier, J.G., Escaig-Haye, F., 1999. In Situ Molecular Hybridization Techniques for Ultrathin Sections. In **Methods in Molecular Biology**, Vol 117: Electron Microscopy Methods and Protocols. Hajibagheri, M A N (ed). London: Imperial Cancer Research Fund, pp 167-181.

França, F.H. 1993. **Cotton Production in Brazil**. Ministério da Agricultura. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 23 p.

Frankenhuyzen, K. 2009. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. **J Invertebr Pathol.** 101(1):1-16.

Gahan, L.J., Gould, F., Heckel, DG. 2001. Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*. **Science.** 293, 857–860.

Gallo, D., Nakano, O., Silveira Neto, S., Carvalho, R.P.L., Batista, G.C., Berti Filho, E., Parra, J.R.P., Zucchi, R.A., Alves, S.B., Vendramin, J.D. 1988. **Manual de entomologia agrícola**. 2 ed. São Paulo: Ceres, 486p.

Gallo, D., Nakano, O., Silveira Neto, S., Carvalho, R.P.L., De Baptista, G.C., Berti Filho, E., Parra, J.R.P., Zucchi, R.A., Alves, S.B., Vendramin, J.D., Marchini, L.C., Lopes, J.R.S., Omoto, C. 2002. **Entomologia agrícola**. FEALQ, Piracicaba, p. 920.

Gardner, W.A., Fuxa, J.R.. 1980. Pathogens for the suppression of the fall armyworm. *Florida Entomol.* 63(4), 439-447.

Ge, B., Bideshi, D., Moar, W.J., Federici, B.A. 1998. Differential effects of helper proteins encoded by the *cry2A* and *cry11A* operons on the formation of Cry2A inclusions in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol Lett.* 165, 35-41.

Gill, S., 1995b, Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* toxins. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 90, 69-74.

Gill, S.S., Cowles, E.A., Pietrantonio, P.V. 1992. The mode of action *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Ann. Rev. Entomol.*, 37: 615-636.

Gill, S.S., Cowles, E.A., Francis, V., 1995a. Identification, isolation, and cloning of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin-binding protein from the midgut of the lepidopteran insect *Heliothis virescens*. *J. Biol. Chem.* 270, 27277-27282.

Glatron, M.F., Rapoport, G. 1972. Biosynthesis of the parasporal inclusion of *Bacillus thuringiensis*: half-life of its corresponding messenger RNA. *C. R. Acad. Sc. Paris.* 269, 1338-1341.

Gleave, A.P., Williams, R., Hedges, R.J. 1993. Screening by polymerase chain reaction of *Bacillus thuringiensis* serotypes for the presence of *cryV*-like insecticidal protein genes and characterization of a *cryV* gene cloned from *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59(5), 1683-1687.

Gómez, I., Miranda-Rios, J., Rudiño-Piñera, E., Oltean, D.I., Gill, S.S., Bravo, A., Soberón, M. 2002. Hydrophobic complementarity determines interaction of epitope 869HITDTNKNK876 in *Manduca sexta* Bt-R1 receptor with loop 2 of domain II of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins. *J. Biol. Chem.* 277, 30137–30143.

Gómez, I., Pardo-Lopez, L., Muñoz-Garay, C., Fernandez, L.E., Perez, C., Sanchez, J., Soberon, M., Bravo, A. 2007. Role of receptor interaction in the mode of action of insecticidal Cry and Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis* *Peptides*. 28, 169-173.

Griffitts, JS., Haslam, SM., Yang, T., Garczynski, SF., Mulloy, B., Morris, H., Cremer, PS., Dell, A., Adang, MJ., Aroian, RV., 2005. Glycolipids as receptors for *Bacillus thuringiensis* crystal toxin. *Science*. 307, 922–925.

Guerchicoff, A., Ugalde, R.A., Rubinstein, C.P. (1997) Identification and characterization of a previously undescribed cyt gene in *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2716–2721.

Guo, S., Liu, M., Peng, D., Ji, S., Wang, P., Yu, Z., Sun, M. 2008. New strategy for isolating novel nematocidal crystal protein genes from *Bacillus thuringiensis* strain YBT-1518. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 6997–7001.

Habib, M.E.M., Andrade, C.F.S. Bactérias entomopatogênicas. In: **Controle microbiano de insetos**. Ed. Alves, S.B., FEALQ, Piracicaba, p. 383-446, 1998.

Haldenwang, W.G. 1995. The sigma factors of *Bacillus subtilis*. *Microbiol. Rev.* 59(1), 1-30.

Hansen, B.M., Salamiou, S. Virulence of *Bacillus thuringiensis*. 2000. In: **Entomopathogenic Bacteria: From Laboratory to Field Application**. Charles, J. *et al.*, eds., pp. 41-64, Kluwer Academic Publishers.

Harlow, E. Lane, D. 1988. **Antibodies: A laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory. United State.

Hofmann, C., Lüthy, P., Hutter, R., Pliska, V. 1988b. Binding of the δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* to brush-border membrane vesicles of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). **Eur. J. Biochem.** 173, 85–91.

Hofmann, C., Vanderbruggen, H., Hofte, H., Van Rie, J., Jansens, S., Van Mellaert, H., 1988a. Specificity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. **Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)**. 85, 7844–7848.

Hofte, H., Seurinck, J., Van Houtven, A., Vaeck, M., 1987. Nucleotide sequence of a gene encoding an insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* toxic against Coleoptera. **Nucleic Acids Res.** 15, 7183.

Hofte, H., Whiteley, HR., 1989. Insecticidal crystal protein of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiol. Rev.** 53(2), 242-255.

Hossain, DM., Shitomi, Y., Moriyama, K., Higuchi, M., Hayakawa, T., Mitsui, T., Sato, R., Hori, H., 2004. Characterization of a novel plasma membrane protein, expressed in the midgut epithelia of *Bombyx mori*, that binds to Cry1A toxins. **Appl. Environ. Microbiol.** 70, 4604–4612.

Ibarra, J., Rincón, C., Ordúz, S., Noriega, D., Benintende, G., Monnerat, R., Regis, L., Oliveira, C.M.F., Lanz, H., Rodriguez, M.H., Sánchez, J., Peña, G., Bravo, A. 2003. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Latin America with insecticidal activity against different mosquito species. **Appl. Environ. Microbiol.** 69, 5269-5274.

Ihara, H., Kuroda, E., Wadano, A., Himeno, M. 1993. Specific toxicity of δ -endotoxins from *Bacillus thuringiensis* to *Bombyx mori*. **Biosc. Biothechnol. Biochem.** 57, 200-204.

Isaac, B.C., Krieger, E.K., Mettus, L.A., Sivasupramaniam, S., Farhad, M., 2001. Polypeptide Compositions Toxic to *Anthonomus* Insects, and Methods of Use. WIPO Patent WO 0187940.

James, C. Global states of commercialized transgenic crops: 2002. **ISAAA Briefs**, ISAAA Ithaca, n.1, 2002.

James, R.R., Croft, B.A., Strauss, S. H. 1999. Susceptibility of the Cottonwood Leaf Beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) to Different Strains and Transgenic Toxins of *Bacillus thuringiensis*. **Environ. Entomol.** 28(1), 108 – 115.

Johnson, D.E., Mcgaughey, W.H. 1996. Contribution of *Bacillus thuringiensis* spores do toxicity of purified Cry proteins towards indianmeal moth larvae. **Curr. Microbiol.** 33, 54-59.

Jones, G.W., Nielsen-Leroux, C., Yang, Y., Yuan, Z., Dumas, V.F., Monnerat, R.G., Berry, C. 2007. A new Cry toxin with a unique two-component dependency from *Bacillus sphaericus*. **FASEB J.** 21, 4112-4120.

Jurat-Fuentes, JL., Adang, MJ., 2004. Characterization of a Cry1Ac receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. **Eur. J. Biochem.** 271, 3127–3135.

Jurat-Fuentes, JL., Adang, MJ., 2006. Cry toxin mode of action in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. **J. Invertebr. Pathol.** 92, 166–171.

Kim, H.S., Saitoh, H., Yamashita, S., Akao, T., Park, Y.S., Maeda, M., Tanaka, R., Mizuki, E., Ohba, M. 2003. Cloning and characterization of two novel crystal protein genes from a *Bacillus thuringiensis* serovar *dakota* strain. **Curr. Microbiol.** 46, 33-38.

Knight, PJ., Crickmore, N., Ellar, DJ., 1994. The receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) δ -endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N. **Mol. Microbiol.** 11, 429– 436.

Knowles, B., 1994. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal δ -endotoxins. **Adv. Insect. Physiol.** 24, 275–308.

Knowles, B.H., Dow, J.A.T. 1993. The crystal δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis*: models for their mechanisms of action on the insect gut. **BioEssays.** 15(7), 469-476.

Knowles, B.H., Ellar, D.J. 1987. Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins with different insect specificity. ***Biochim. Biophys. Acta.*** 924, 509-518.

Knowles, B.H., Farndale, R.W. 1988. Activation of insect cell adenylate cyclase by *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins and melittin. Toxicity is independent of cyclic AMP. ***Biochem. J.*** 253, 235–241.

Kostichka, K., Warren, G.W., Mullins, M., Mullins, A.D., Craig, J.A., Koziel, M.G. Estruch, J. J. 1996. Cloning of a *cryV*-type insecticidal protein gene from *Bacillus thuringiensis*: the *cryV*-encoded protein is expressed early in stationary phase. ***J. Bacteriol.*** 178 (7), 2141-2144.

Krieg, A. (1971). Is the potential pathogenicity of bacilli for insects related to production of alpha-exotoxin. ***J. Invertebr. Pathol.*** 18, 425-426.

Krywunczyk, J., Fast, P.G. 1980. Sorological relationships of the crystals of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. ***J. Invertebr. Pathol.*** 36, 139-140.

Kuo, J., Fox, E., MacDonald, S., 1992. **Sigmastat**: statistical software for working scientists. Users manual. Jandel Scientific, San Francisco, CA.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. ***Nature***: 227, 680-685.

Lecadet, M. M.; Chaufaux, J.; Ribier, J., Lereclus, D. 1991. Construction of novel *Bacillus thuringiensis* strain with different insecticidal activities by transduction and transformation. ***Appl. Environ. Microbiol.*** 58, 840-849.

Lereclus, D. Agaisse, H., Gominet, M., Chaufaux, J., 1995. Overproduction of encapsulated insecticidal crystal proteins in *Bacillus thuringiensis* spoOA mutant. ***Bio/Technology.*** 13, 67 – 71.

Lereclus, D., Bourgoquin, C., Lecadet, M.M., Klier, A. Rapoport, G. Role, structure, and molecular organization of the genes coding for the parasporal δ -endotoxins of *Bacillus*

thuringiensis. 1989. In: **Regulation of Prokaryotic Development**. Issar Smith, Ralph A. Slepecky and Peter Setlow (Ed.). American Society for Microbiology, Washington, DC,

Lereclus, D., Delécluse, A., Lecadet, M-M. Diversity of *Bacillus thuringiensis* Toxins and Genes. 1993. In: ***Bacillus thuringiensis*, An Environmental biopesticide: Theory and Practice**. Enwistle P.F., Cory J.S., Bailey M.J., and Higgs S. Eds., John Wiley e Sons Ltd., West Sussex, England, pp. 37-69.

Levinson, B.L., Kasyan, K.J., Chiu, S.S., Currier, S., González Jr., J.M. 1990. Identification of β -exotoxin production, plasmids encoding β -exotoxin, and a new exotoxin in *Bacillus thuringiensis* by using high-performance liquid chromatography. **J. Bacteriol.** 172, 3172-3179.

Li, J., Carroll, J., Ellar, D.J. 1991. Crystal structure of insecticidal delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5Å resolution. **Nature**: 353, 815-821.

Liang, Y., Patel, S.S., Dean, D.H. 1995. Irreversible binding kinetics of *Bacillus thuringiensis* CryIA-endotoxins to *Gypsy moth* brush border membrane vesicles is directly correlated to toxicity. **J. Biol. Chem.** 270, 24719-24724.

Lloyd, E. P. Ecologia do bicudo do algodoeiro. 1986. In: **O bicudo do algodoeiro**. Barbosa, S., Lukefahr, M.J. Braga Sobrinho, R.B. eds. Brasília, EMBRAPA-DDT. p. 135-144. (EMBRAPA –DDT. Documentos, 4).

Loguercio, L.L., Carneiro, P.N., Carneiro, A.A. 2002. Milho Bt. Alternativa biotecnológica para controle biológico de insetos-praga. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**. 24, 46-52.

López-Pazos, S.A. Gómez, J.E.C., Cerón, J.A. 2009. Cry1B and Cry3A are active against *Hypothenemus hampei* Ferrari (Coleoptera: Scolytidae). **J. Invertebr. Pathol.** doi:10.1016/j.jip.2009.05.011

Losick, R.; Youngman, P. And Piggot, P. J. Genetics of endospore formation in *Bacillus subtilis*. **Ann. Rev. Genet.**, 20:625-659, 1986.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.

Luo, K., Lu, Y. J., Adang, M. J. 1996. A 106 kDa form of aminopeptidase is a receptor of *Bacillus thuringiensis* Cry1C δ -endotoxin in the brush border membrane of *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 26, 783-791.

Luo, K., Tabashnik, B. E., Adang, M. J. 1997. Binding of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin to aminopeptidase in susceptible and resistant diamondback moths (*Plutella xylostella*). *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1024-1027.

Luttrell, R.G., Fitt, G.P., Ramalho, F.S., Sugonyaev, E.S., 1994. Cotton pest management: Part 1. A worldwide perspective. *Annu. Ver. Entomol.* 39, 517-526.

Marchler-Bauer, A., Bryant, S.H. 2004. CD-Search: protein domain annotations on the fly. *Nucleic Acids Res.* 32, 327-331.

Martin, D.F., Barbosa, S., Campanhola, C. 1987. **Observações preliminares e comentário sobre o bicudo do algodoeiro no Estado de São Paulo.** Jaguariúna, EMBRAPA-CNPDA. 21 p. (EMBRAPA-CNPDA, Circular Técnica, 1).

Martínez, W. 2004. Evaluación de la toxicidad de *Bacillus thuringiensis*. In: *Bacillus thuringiensis en el control biológico.* Bravo, A. y Cerón, J. eds. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. pp. 207-232.

Martins, É.S., Aguiar, R.W.S., Martins, N.F., Melatti, V.M., Falcão, R., Gomes, A.C.M.M., Ribeiro, B.M., Monnerat, R.G., 2008. Recombinant Cry1Ia protein is highly toxic to cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*) and fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*). *J. Appl. Microbiol.* 104, 1363-1371.

Martins, É.S., Aguiar, R.W.S., Monnerat, R.G., Ribeiro, B.M., 2006. Cry1Ba Protein is Toxic to Cotton Boll Weevil (*Anthonomus grandis* Boheman). Direct Submission, *Bacillus thuringiensis* Toxin Nomenclature. <http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt>.

Martins, E.S., Praça, L.B., Dumas, V.F., Silva-Werneck, J.O., Sone, E.H., Waga, I.C., Berry, C., Monnerat, R.G. 2007. Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates toxic to cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*). **Biol. Control**. 40, 65–68.

Masson, L., Erlandson, M., Puzstai-Carey, M., Brousseau, R., Juárez-Pérez, V., Frutos, R. 1998. A holistic approach for determining the entomopathogenic potential of *Bacillus thuringiensis* strains. **Appl. Environ. Microbiol.** 64(12), 4782-4788.

McNall, R.J., Adang, M.J., 2003. Identification of novel *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac binding proteins in *Manduca sexta* midgut through proteomic analysis. **Insect Biochem. Mol. Biol.** 33, 999–1010.

McPherson, S., Perlak, F., Fuchs, R., Marrone, P., Lavrik, P., Fischhoff, D. 1988. Characterization of the Coleopteran-specific protein gene of *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. **Bio/Technology** 6, 61–66.

Meiyalaghan, S., Jacobs, J.M.F., Butler, R.C., Wratten, S.D., Conner, A.J., 2006. Transgenic potato lines expressing *cry1Ba1* or *cry1Ca5* genes are resistant to potato tuber moth. **Potato Res.** 49, 203-216.

Melo, I.S., Azevedo, J.L. 2000. **Controle Biológico**. Volume 3. 1ª edição. São Paulo: Embrapa Meio Ambiente, 388p.

Méndez-López, I., Basurto-Ríos, R. & Ibarra, J. 2003. *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* is highly toxic to the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferr. Coleoptera : Scolytidae). **FEMS Microbiol Lett.** 226, 73-77.

Mettus, A.L., Baum, J.A. 2000. Polypeptide Compositions Toxic to (Diabrotica) Insects, Obtained from *Bacillus thuringiensis*; CryET70, and Methods of Use. WIPO Patent WO 026378.

Mineki, R., Taka, H., Fujimura, T., Kikkawa, M., Shindo, N., Murayama, K. 2002. *In Situ*, alkylation with acrylamide for identification of cysteinil residues in proteins during one-and

two-dimensional sodium dodecil sulphate poliacrylamide gel electrophoresis. *Proteomics* 2, 1672–1681.

Miranda, J. E. **Distribuição vertical de lagartas de *Spodoptera frugiperda* no algodoeiro.** Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006. (Embrapa Algodão.Comunicado Técnico, 277).

Monnerat, R. G.; Dias, S. C.; Oliveira-Neto, O. B. de; Nobre, S. D.; Silva-Werneck, J. O., Sá, M. F. G. 2000b. **Criação Massal do Bicudo do Algodoeiro *Anthonomus grandis* em Laboratório.** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, N.º 42, 5p, 2000.

Monnerat, R.G., Batista, A.C., Medeiros, P.T., Martins, E.S., Melatti, V.M., Praça, L.B., Dumas, V.F., Morinaga, C., Demo, C., Gomes, A.C.M., Falcão, R., Brod, C.S., Silva-Werneck, J.O., Berry, C. 2007. Screening of Brazilian *Bacillus thuringiensis* isolates active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatilis*. *Biol. Control*. 41(3), 291-295.

Monnerat, R.G., Praça, L.B., Martins, E.S., Dumas, V.D., Ramos, F.R., Berry, C. 2006. Atividade de toxinas individuais de *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* contra larvas do Bicudo do Algodoeiro, *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Cuculionidae). Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento n.º 141, 12p.

Monnerat, R.G., Praça, L.B., Martins, É.S., Dumas, V.F., Ramos, F.R., Berry, C. 2006. **Atividade de toxinas individuais de *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* contra larvas do bicudo do algodoeiro, *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Cuculionidae).** Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Boletim de Pesquisa, 141).

Monnerat, R.G.; Silva, S.F.; Silva-Werneck J.O. 2001. **Catálogo do Banco de germoplasma de bactérias entomopatogênicas do gênero *Bacillus*.** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 65p.

Monnerat, R.G., Bravo, A. 2000a. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. In: **Controle Biológico**, eds. Melo, I.S., Azevedo, J.L., Jaguariúna, SP, Embrapa Meio Ambiente, v. 3, p.163-200.

Montesbravo, E. P. **Controle biológico de *Spodoptera frugiperda* Smith en maiz.** Disponível em: <<http://codagea.edoags.gob.mx/~produce/SPODOPTTE.htm>>. Acesso em: 26 abr. 2001.

Nagamatsu, Y., Toda, S., Koike, T., Miyoshi, Y., Shigematsu, S., Kogure, M., 1998b. Cloning, sequencing, and expression of the *Bombyx mori* receptor for *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIA(a) toxin. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 62, 727–734.

Nagamatsu, Y., Toda, S., Yamaguchi, F., Ogo, M., Kogure, M., Nakamura, M., Shibata, Y., Katsumoto, T. 1998a. Identification of *Bombyx mori* midgut receptor for *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIA (a) toxin. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 62, 718–726.

Naimov, S., Weemen-Hendriks, M., Dukiandjiev, S., de Maagd, R.A. 2001. *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1 hybrid proteins with increased activity against the Colorado potato beetle. **Appl. Environ. Microbiol.** 67, 5328–5330.

Nathan, S., Aziz, D., Mahadi, N., 2006. Phage displayed *Bacillus thuringiensis* Cry1Ba4 toxin is toxic to *Plutella xylostella*. **Curr. Microbiol.** 53(5), 412-415.

OMS. 1987. **Report of an informal consultation on the detection, isolation, identification and ecology of biocontrol agents of diseases vectors.** UNDP: World Bank: Who. Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases, TDR/BCV/IC-GE/87.3. 41 p.

Pacheco, S., Gómez, I., Gill, SS., Bravo, A., Soberón, M., 2009. Enhancement of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins by fragments of a toxin-binding cadherin correlates with oligomer formation. **Peptides.** 30, 583 – 588.

Pallini, A., Silvie, P., Monnerat, RG., Ramalho, FFS., Songa, JM., Birch, ANE., 2006. Non-target and biodiversity impacts on parasitoids. In: **Environmental Risk Assessment of Genetically Modified Organisms** volume 2: Methodologies for Assessing Bt Cotton in Brazil. Hilbeck, A, Andow, DA, Fontes, EMG. (Eds.). CABI Publishing, Wallingford,UK, pp. 200–224.

Park, H.W., Ge, B., Bauer, L.S. Federici, B.A. 1998. Optimization of Cry3A Yields in *Bacillus thuringiensis* by Use of Sporulation-Dependent Promoters in Combination with the STAB-SD mRNA Sequence. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(10), 3932-3938.

Peres, J.R.R. 2001. Transgênicos: os benefícios para um agronegócio sustentável. *Cadernos de Ciência & Tecnologia.* Ministério da Agricultura e do Abastecimento. 18(1), 13-26.

Perlak, F. J., Deaton, R. W., Armstrong, T. A., Fucrs, R. L., Sims, S. R., Greenplate, J. T., Fischhoff, D. A. 1990. Insect resistant cotton plants. *Bio/technology.* 8, 939-943.

Pietrantonio, PV., Gill, SS. 1996. *Bacillus thuringiensis* endotoxins: action of the insect midgut. In: **Biology of the insect midgut.** Lehane, MJ., Billingsley, PF. (Eds). London: Chapman e Hall, p. 345-372.

Pigott, CR., Ellar, DJ., 2007. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiol. Mol. Biol. R.* 71(2), 255-281.

Ponchio, L. A. **Paridade de preços nos mercados nacional e internacional do algodão e a competitividade da cotonicultura brasileira.** 2001. 48p. Tese de Graduação. ESALQ, Piracicaba, 2001

Praça, L.B.; Martins, E.S., Gomes, A.C.M.M.; Falcão, R., Monnerat, R.G. 2004. Prospecção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos das ordens Lepdoptera, Coleoptera e Diptera. *PAB*, volume 39 (1): 11-16.

Rabinovitch, L., Silva, C.M.B., Alves, R.S. De A. 2000. Controle biológico de vetores de doenças tropicais utilizando *Bacillus* entomopatogênicos. In: **Controle Biológico**, eds. Melo, I.S, Azevedo, J.L, Jaguariúna, SP, Embrapa Meio Ambiente, v. 2, p.17-90.

Rajagopal, R., Agrawal, N., Selvapandiyan, A., Sivakumar, S., Ahmad, S., Bhatnagar. RK. 2003. Recombinantly expressed isozymic aminopeptidases from *Helicoverpa armigera* midgut display differential interaction with closely related Cry proteins. *Biochem. J.* 370, 971-978.

Ravoahangimalala, O., Charles, JF., Schoeller-Raccaud, YJ., 1993, Immunological localization of *Bacillus thuringiensis* serovar israelensis toxin in midgut cells of intoxicated *Anopheles gambiae* larvae (Diptera: Culicidae). *Res. Microbiol.* 44, 271-278.

Ribier, J., Lecadet, M.M. 1973. Etude ultrastructurale et cinétique de la sporulation de *Bacillus thuringiensis* var. *berliner* 1715. Remarques sur la formation de l'inclusion parasporale. *Ann. Microbiol. (Int. Pasteur)*. 124A, 311-344.

Rodrigo-Simón, A., Caccia, S., Ferré, J., 2008. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin-binding and pore-forming activity in brush border membrane vesicles prepared from anterior and posterior midgut regions of lepidopteran larvae. *Appl. Environ. Microb.* 74(6), 1710-1716.

Ruiz de Escudero, I., Estela, A., Porcar, M., Martinez, C., Oguiza, J.A., Escriche, B., Ferre, J., Caballero, P. 2006. Molecular and insecticidal characterization of a CryII protein toxic to insects of the families Noctuidae, Tortricidae, Plutellidae, and Chrysomelidae. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 4796–4804.

Rukmini, V., Reddy, C.Y., Venkateswerlu, G. 2000. *Bacillus thuringiensis* crystal δ -endotoxin: Role of proteases in the conversion of protoxin to toxin. *Biochimie*: 82, 109-116.

Rupar, M.J., Donovan, W.P., Tan, Y., Slaney, A.C. 2000. *Bacillus thuringiensis* CryET29Composition Toxic to Coleopteran Insects and Ctenocephalides spp. US Patent 6093695.

Sambrook, J., Fritsch, EF., Maniatis, T., 2001. **Molecular Cloning**: A Laboratory Manual, Third ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Sangadala, S., Walters, FS., English, LH., Adang, MJ. 1994. A mixture of *Manduca sexta* aminopeptidase and phosphatase enhances *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIA(c) toxin binding and $86\text{Rb}^+ - \text{K}^+$ efflux in vitro. *J. Biol. Chem.* 269, 10088–10092.

Sauka DH., Sánchez, J., Bravo A., Benintende, G., 2007. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins against bean shoot borer (*Epinotia aporema* Wals.) larvae, a major soybean pest in Argentina. **J. Invertebr. Pathol.** 94, 125-129

Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D., Dean, D., 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 62,775–806

Schnepf, H.E., Whitley, H.R. 1981. Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*. **PNAS**: 78(5), 2893-2897.

Secchi, V. A. (2002). Baculovirus, mais do que uma grande descoberta: uma revolucionária alternativa aos agrotóxicos. **Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável.** 3(3), 49-54.

Sekar, V., Thompson, D.V., Maroney, M.J., Bookland, R.G., Adang, M.J. 1987. Molecular cloning and characterization of the insecticidal crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 84, 7036-7040.

Shibano Y, Yamagata A, Nakamura N, Iizuka T, Sugisaki H, Takanami M. 1985. Nucleotide sequence coding for the insecticidal fragment of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein. **Gene**: 34, 243-51.

Shimada, N., Kim, Y.S., Miyamoto, K., Yoshioka, M., Murata, H. 2003. Effects of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab Toxin on Mammalian Cells. **J. Vet. Sci.** 65(2), 187-191.

Shimizu, T., Morikawa, K. 1996. The β -prism: a new folding motif. **Trends. Biochem. Sci.** 21, 3-6.

Shin, B. S., Park, S. H., Choi, S. K., Koo, B. T., Lee, S. T., Kim, J. I. 1995. 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*. **Appl. Environ. Microbiol.** 61 (6), 2402-2407.

Silva, F.B., Oliveira, M.G. De A., Batista, R.B., Pires, C.V., Xavier, L.P. Piovesan, N.D., De Oliveira, J.A., José, I.C., Moreira, A. 2002. Função fisiológica de lipoxigenases de folhas de soja submetidas ao ataque de lagarta (*Anticarsia gemmatalis* HÜBNER). *Arquivos do Instituto Biológico*: 69(1), 67-74.

Silvie, P., Leroy, T., Belot, J.L., Michel, B. 2001. **Manual de identificação das pragas, e seus danos no algodoeiro**. 1st ed. Cascavel: COODETEC/ CIRADCA, 2001. 74 p. (B.T.N.º 35).

Soberón M., Pardo-López L., López I., Gómez I., Tabashnik B., Bravo A., 2007a. Engineering Modified Bt Toxins to Counter Insect Resistance. *Science*. 318, 1640-1642.

Soberón, M., Fernandez, L.E., Perez, C., Gill, S.S., Bravo, A., 2007b. Mode of action of mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* toxins. *Toxicon*. 49, 597-600.

Song, F., Zhang, J., Gu, A., Wu, Y., Han, L., He, K., Chen, Z., Yao, J., Hu, Y., Li, G., Huang, D. 2003. Identification of cryII-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains and characterization of a novel cryII-type gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(9), 5207-5211,

Taylor, R., Tippet, J., Gibb, G., Pells, S., Pike, D., Jordan, L., Ely, S., 1992. Identification and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin entomocidal to coleopteran and lepidopteran larvae. *Mol. Microbiol.* 6, 1211–1217.

Thorne, L., Garduno, F., Thompson, T., Decker, D., Zounes, M., Wild, M., Walfield, A.M., Pollock, Tj. 1986. Structural similarity between the lepidoptera- and diptera-specific insecticidal endotoxin genes of *Bacillus thuringiensis* subsp. "kurstaki" and "israelensis". *J. Bacteriol.* 166(3), 801-11.

Thorpe, J. R., 1999. The application of LR Gold resin for immunogold labeling. In **Methods in Molecular Biology**, Vol 117: Electron Microscopy Methods and Protocols. Hajibagheri, M A N (ed). London: Imperial Cancer Research Fund, pp167-181.

Toledo, D. M., Brodsky, H. A., Pardo, G. E., Conci, O. C., Braga Sobrinho, R. Monitoreo del Picudo del Algodonero (*Anthonomus grandis* Bh.) em el Noreste Argentino. Universidad Nacional Del Nordeste, Comunicaciones Científicas y Tecnológicas, 2000.

Tounsi, S., Jaoua, S. 2002. Identification of a promoter for the cristal protein-encoding gene cry1Ia from *Bacillus thuringiensis* subs. *kurstaki*. FEMS Microbiology Letters: 208, 215-218.

Tounsi, S., Zouari, N. & Jaoua, S. 2003. Cloning and study of the expresión of a novel cry1Ia-type gene from *Bacillus thuringiensis* subs. *kurstaki*. **J. Appl. Microbiol.** 95, 23-28.

Tsuchiya, S., Kasaishi, Y., Harada, H., Ichimatsu, T., Saitoh, H., Mizuki, E., Ohba, M. 2002. Assessment of the efficacy of Japanese *Bacillus thuringiensis* isolates against the cigarette beetle, *Lasioderma serricorne* (Coleoptera: Anobiidae). **J. Invertebr. Pathol.** 81 (2), 122-126.

Vadlamudi, RK., Weber, E., Ji, I., Ji, TH., Bulla Jr, LA., 1995. Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. **J. Biol. Chem.** 270, 5490–5494.

Valaitis, AP., Jenkins, JL., Lee, MK., Dean, DH., Garner, KJ., 2001. Isolation and partial characterization of gypsy moth BTR-270, an anionic brush border membrane glycoconjugate that binds *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins with high affinity. **Arch. Insect. Biochem. Physiol.** 46, 186–200.

Van Rie, J., Jansens, S., Höfte, H., Degheele, D., Van Mellaert, H., 1989. Specificity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin: importance of specific receptors on the brush border membrane of the mid-gut of target insects. **Eur. J. Bioch.** 186, 239-247.

Vassal, J.M., Barjac, H.D., Frutos, R., Federici, B.A. 1993. Isolation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* from diseased field-collected larvae of the saturniid moth, *Hylesia metabus*, in French Guiana. **FEMS Microbiol. Lett.** 107, 199–204

Ward, ES., Ellar, DJ., 1983. Assignment of the delta-endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* to a specific plasmid by curing analysis. **FEBS Lett.** 158(1), 45-49.

Weathersbee III, A.A., Lapointe, S.L., Shatters Jr., R.G. 2006. Activity of *Bacillus thuringiensis* isolates against *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae). **Florida Entomol.** 89(4), 441-448. 2

Whiteley, H.R., Schnepf, H.E. 1986. The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. **Ann. Rev. Microbiol.** 40, 549-576.

Wolfenberger, D.A., Hamed, A.A., Luttrell, R.G. 1987. **Toxicity of *Bacillus thuringiensis* against the boll weevil *Anthonomus grandis* Boh. (Coleoptera, Curculionidae).** Beltsville Cotton Conferences, p. 1296-1300, 1997.

Wolfenberger, DA., Hamed, AA., Luttrell, RG., 1997. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* against the boll weevil *Anthonomus grandis* Boh. (Coleoptera, Curculionidae). **Beltsville. Cotton. Conf.** 1296–1300.

Wolfersberger, MG., 1984. Enzymology of plasma membranes of insect intestinal cells. **Am. Zool** 24:187–197.

Wong, H.C., Chang, S. 1986. Identification of a positive retroregulator that stabilizes mRNAs in bacteria. **Proc.Nati.Acad. Sci USA.** 83, 3233-3237.

Wong, H.C., Schnepf, H.E., Whiteley, H.R. 1983. Transcriptional and translational start sites for the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene. **J. Biol. Chem.** 258, 1960-1967.

Yaoi, K., Kadotani, T., Kuwana, H., Shinkawa, A., Takahashi, T., Iwahana, H., Sato, R. 1997. Aminopeptidase N from *Bombix mori* as a candidate for the receptor of *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin. **Eur. J. Biochem.** 246, 652-657.

Yousten, A. A. 1984. *Bacillus sphaericus*: Microbiological factors Relateds to its Potencial as a Mosquito Larvicide. **Adv. in Biothechnol. Proc.** 3, 315-343.

Yu, C-G., Mullins, M. A., Warren, G. W., Koziel, M. G., Estruch, J. J. 1997. The *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A lyses midgut epithelium cells of susceptible insects. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 532-536.

Zhang, X, Candas, M., Griko, NB., Taussig, R., Bulla Jr., LA., 2006. A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 103, 9897–9902

Zhang, X., Candas, M., Griko, N. B., Rose-Young, L. and Bulla Jr., LA., 2005. Cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin depends on specific binding of the toxin to the cadherin receptor BT-R(1) expressed in insect cells. *Cell. Death. Differ.* 12, 1407–1416.

Zhong, C., Ellar, DJ., Bishop, A., Johnson, C., Linc, S., Hartc, ER., 2000. Characterization of a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin which is toxic to insects in three orders. *J. Invertebr. Pathol.* 76(2), 131-139.

ANEXOS

Anexo I – Artigo publicado na revista Biological Control

Martins, E.S., Praça, L.B., Dumas, V.F., Silva-Werneck, J.O., Sone, E.H., Waga, I.C., Berry, C., Monnerat, R.G. 2007. Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates toxic to cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*). **Biol. Control**. 40, 65–68.

Anexo II – Artigo submetido a revista Insect Biochemistry and Molecular Biology

Martins, E.S., Monnerat, R.G., Queiroz, P.R., Dumas, V.F., Braz, S.V., Aguiar, R.W.S., Gomes, A.C.M.M., Sánchez, J., Bravo, A. Ribeiro, B.M. 2009. Midgut GPI- anchored proteins with alkaline phosphatase activity from the cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*) are the putative receptors for the Cry1B protein of *Bacillus thuringiensis*. **Insect Bioch. Mol. Biol.**