

**ESTUDO DA ATIVIDADE DA PROTEÍNA CRY1IA EXPRESSA EM CÉLULAS DE
INSETO PROMISSORA PARA O CONTROLE DO BICUDO DO ALGODOEIRO
(*Anthonomus grandis* Boheman) E DA LAGARTA DO CARTUCHO-DO-MILHO
(*Spodoptera frugiperda*)**

República Federativa do Brasil

Luiz Inácio Lula da Silva
Presidente

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Roberto Rodrigues
Ministro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Conselho de Administração

Luis Carlos Guedes Pinto
Presidente

Silvio Crestana
Vice-Presidente

Alexandre Kalil Pires
Ernesto Paterniani
Helio Tollini
Marcelo Barbosa Saintive
Membros

Diretoria-Executiva da Embrapa

Silvio Crestana
Diretor Presidente

José Geraldo Eugênio de França
Kepler Euclides Filho
Tatiana Deane de Abreu Sá
Diretores Executivos

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

José Manuel Cabral de Sousa Dias
Chefe-Geral

Maurício Antônio Lopes
Chefe-Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Maria Isabel de Oliveira Penteado
Chefe-Adjunto de Comunicação e Negócios

Maria do Rosário de Moraes
Chefe-Adjunto de Administração

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 92

**ESTUDO DA ATIVIDADE DA PROTEÍNA CRY1IA EXPRESSA
EM CÉLULAS DE INSETO PROMISSORA PARA O CONTROLE
DO BICUDO DO ALGODOEIRO (*Anthonomus grandis*
Boheman) E DA LAGARTA DO CARTUCHO-DO-MILHO
(*Spodoptera frugiperda*)**

Érica Soares Martins

Raimundo Wagner de Sousa Aguiar

Natália Florêncio Martins

Andréia Cardoso Batista

Viviane Melatti

Bergmann Moraes Ribeiro

Rose Gomes Monnerat

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Serviço de Atendimento ao Cidadão

Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) –

Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 3348-4739 Fax: (61) 3340-

3666 <http://www.cenargen.embrapa.br>

e.mail: sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Maria Isabel de Oliveira Penteado*

Secretário-Executivo: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

Membros: *Arthur da Silva Mariante*

Maria Alice Bianchi

Maria de Fátima Batista

Maurício Machain Franco

Regina Maria Dechechi Carneiro

Sueli Correa Marques de Mello

Vera Tavares de Campos Carneiro

Supervisor editorial: *Maria da Graça S. P. Negrão*

Normalização Bibliográfica: *Maria Iara Pereira Machado*

Editoração eletrônica: *Maria da Graça S. P. Negrão*

1ª edição

1ª impressão (2005):

A 532 Análise da variabilidade genética de uma população de *Anticarsia*

gemmatalis (Lepidoptera: Noctuidae) por meio de marcadores moleculares
RAPD / Érica Soares Martins ... [et al.]. – Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e
Biotecnologia, 2005.

29 p. – (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos
Genéticos e Biotecnologia, 1676 – 1340; 92)

1. *Bacillus thuringiensis* – bactéria. 2. *Bacillus thuringiensis* - isolamento e
caracterização - gene da estirpe S1451 - tóxica à insetos. 3. *Spodoptera frugiperda*
– inseto praga. 4. *Anthonomus grandis* – inseto praga. 5. Algodão transgênico –
construção de cultivares. I. Martins, Érica Soares. II. Série.

595.78 – CDD 21.

SUMÁRIO

Resumo.....	6
Abstract	7
Introdução	8
Material e Métodos	9
1 – Vírus e Células	9
2 – Manipulação do DNA	10
3- Construção, purificação e análise do baculovírus recombinante.....	11
4 – Análise transcricional do gene cry1la expresso em células de inseto	12
5 – Produção de anti-soro policlonal contra Cry1I	12
6 – Análise da expressão da proteína Cry1la.....	13
7 – Bioensaio com a proteína recombinante.....	13
8 – Análise estrutural de prováveis cristais da proteína recombinante Cry1la..	14
9 – Análise ultraestrutural de intestinos de A. grandis inoculadas com a proteína recombinante Cry1la	15
10 – Modelagem da proteína Cry1la.....	15
Resultados	15
1 – Clonagem e sequenciamento do gene cry1la	15
2 – Construção e purificação do baculovírus recombinante vSynBtCry1la.....	17
3 – Análise transcricional do gene cry1la expresso em células de inseto	17
4 – Análise da expressão da proteína Cry1la em gel de poliacrilamida SDS- PAGE e Imuno-deteção	18
5 – Bioensaio com proteína recombinante Cry1la.....	19
6 – Análise estrutural de prováveis cristais da proteína recombinante Cry1la..	22
7 – Modelagem da proteína Cry1la.....	23
Discussão	24
Referências Bibliográficas.....	28

**ESTUDO DA ATIVIDADE DA PROTEÍNA CRY1IA
EXPRESSA EM CÉLULAS DE INSETO PROMISSORA
PARA O CONTROLE DO BICUDO DO ALGODOEIRO
(*Anthonomus grandis* Boheman) E DA LAGARTA DO
CARTUCHO-DO-MILHO (*Spodoptera frugiperda*)**

Érica Soares Martins

Raimundo Wagner de Sousa Aguiar

Natália Florêncio Martins

Andréia Cardoso Batista

Viviane Melatti

Bergmann Morais Ribeiro

Rose Gomes Monnerat

Resumo

O algodão é uma das mais importantes culturas em nível mundial, e hospedeiro de um grande número de pragas, como *Spodoptera frugiperda* e *Anthonomus grandis*. Uma alternativa para o controle desses insetos é a construção de cultivares de algodão transgênicos, contendo gene(s) de resistência a esses insetos. *Bacillus thuringiensis* é uma bactéria que produz toxinas entomopatogênicas que são amplamente usadas como agentes de controle biológico e como fonte de genes para construção de plantas transgênicas resistentes a insetos. O objetivo deste trabalho foi o isolamento e a caracterização de um gene da estirpe S1451 de *B. thuringiensis* tóxica a esses insetos. O gene *cry1la* da estirpe S1451 foi amplificado por PCR usando oligonucleotídeos específicos, seqüenciado, clonado no vetor de transferência pSynXIVX3+ e usado para construção de um baculovírus recombinante. A proteína Cry1la foi expressa em células de inseto infectadas com o vírus recombinante, produzindo grandes inclusões protéicas no citoplasma celular. Bioensaios usando a proteína recombinante mostraram alta toxicidade a larvas de *S. frugiperda* e *A. grandis*. Modelagem molecular usando a seqüência da proteína traduzida a partir da seqüência gênica obtida mostrou que essa proteína possivelmente possui uma estrutura semelhante à proteína Cry3A. Estudos histopatológicos em células do intestino médio de *A. grandis* mostraram o efeito citotóxico dessa proteína nas mesmas. Dessa forma, acreditamos que este gene poderá vir a ser usado para a construção de plantas transgênicas com resistência a essas importantes pragas do algodão.

Abstract

Cotton is one of the most important crop in the world and host to a large number of pests like *Spodoptera frugiperda* and *Anthonomus grandis*. One option to control these insects is a transgenic cotton containing insecticidal genes. *Bacillus thuringiensis* is a bacterium that produces entomopathogenic toxins used in biological control and as source of genes to transform plants. The aim of this work was the isolation and the characterization of a gene from *B. thuringiensis* strain S1451 toxic to these insects. The gene *cry1Ia* was amplified by PCR, sequenced and cloned in the shuttle vector pSynXIVX3+ and used for a construction of a recombinant virus. The protein Cry1Ia was expressed in insect cells producing a large protein inclusion inside the cytoplasm of insect cells. Bioassays using purified recombinant toxins showed a high toxicity to *S. frugiperda* and *A. grandis* larvae. Molecular modeling using this protein showed similarity to the protein Cry3A. Histopathology studies demonstrated cytotoxic effects of this protein in the midgut of boll weevil larvae. This gene could be used for the synthesis of insect resistant cotton.

Introdução

Bacillus thuringiensis (Bt) é uma bactéria Gram positiva, caracterizada pela produção de cristais protéicos, com atividade inseticida durante a esporulação. Esses cristais são compostos por proteínas que exibem alta atividade específica contra larvas de insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Homoptera, Orthoptera e algumas espécies das ordens Nematoda, Protozoa e Acari (FEILTEISON, 1994). Essas proteínas são conhecidas como δ -endotoxinas devido a sua localização intracelular e como proteínas Cry por sua natureza cristalina (KOSTICHKA et al., 1996). As toxinas Cry apresentam um espectro de ação normalmente restrito a uma ordem de insetos. Atualmente, mais de 300 genes *cry* já foram seqüenciados e as proteínas Cry estão classificadas em 49 grupos organizados em diferentes subgrupos, além de dois grupos de toxinas Cyt, em função do grau de similaridade e identidade de seus aminoácidos. A atualização constante desses dados pode ser visualizada via Internet. (CRICKMORE et al., 2005).

Taylor et al. (1992) descreveram uma nova classe de genes *cry* codificadores de proteínas denominados *cry1Ia*, que possui 62% de homologia com o gene *cry1Ba* e codifica uma protoxina de 81kDa, que quando ativada proteoliticamente é clivada em uma toxina de aproximadamente 65 kDa (GLEAVE et al., 1993), com atividade inseticida para *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera) e para *Leptinotarsa decimlineata* (Coleoptera) (TAILOR et al., 1992; TOUNSI et al., 2003).

O bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis*) é um inseto endófago, considerado uma das pragas mais importantes da cotonicultura pelos danos que causa e pela dificuldade do seu controle (MONNERAT et al., 2002). O prejuízo, caso não se controle o número de insetos, pode ser de 75% da produção total de fibras (AGRIDATA, 2002). *Spodoptera frugiperda* 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).

O mecanismo de resistência de plantas a fitófagos tem sido amplamente estudado para vários microorganismos e insetos. O uso de microorganismos, tais como o *B. thuringiensis*, que é um candidato natural como fonte de genes de resistência a insetos, é uma alternativa para o controle do bicudo, reduzindo o uso excessivo de agrotóxicos que causam poluição e contaminação do meio ambiente.

Neste trabalho, foi descrita a clonagem, o sequenciamento e a atividade inseticida do produto do gene *cry1Ia* para o bicudo do algodoeiro (*A. grandis*) e para lagarta do

cartucho-do-milho (*S. frugiperda*) que apresentou resultados interessantes, indicando que este é um gene promissor para a construção de novas cultivares de plantas, resistentes a estes insetos.

Material e Métodos

1 – Vírus e Células: O baculovírus selvagem *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) e os vírus recombinantes vSyngalVI- (WANG et al., 1991; O'REILLY et al., 1992), vSynBtCry1Ia (produzido neste trabalho) foram propagados em células de *Trichoplusia ni* (BTI-Tn5B1-4) em cultura (GRANADOS et al., 1994). As células foram mantidas em meio TC-100 (GIBCO-BRL) suplementado com 10% de soro fetal bovino a 27 °C.

Células de *Escherichia coli* DH5- α (Invitrogen) foram usadas como hospedeiras para os plasmídeos usados no trabalho.

2 – Manipulação do DNA: As técnicas de clonagem molecular usadas foram as descritas por (SAMBROOK et al., 2001). Todos os oligonucleotídeos usados no trabalho foram sintetizados pela Invitrogen.

O gene *cry1I*, derivado da estirpe de *Bacillus thuringiensis* S1451, pertencente ao Banco de *Bacillus* spp. Entomopatogênicos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia foi, primeiramente, amplificado por PCR, usando os oligonucleotídeos Cry1IaF e Cry1IaR (Tabela 1), que foram desenhados a partir da sequência do gene *cry1Ia* (número de acesso no Genbank = X62821) (TAILOR et al., 1992). Foram adicionados, nas sequências dos oligonucleotídeos, sítios para a enzima *Bam* HI. O programa de PCR utilizado para a amplificação foi: 94°C/5 min, 3 ciclos de 95°C/1 min, 49°C/1 min e 30 s, 72°C/1 min 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 uma extensão final de 72°C/7 min. O fragmento amplificado foi, inicialmente, clonado no vetor pGEM-T easy (Promega) e amplificado em *E.coli* (Invitrogen) de acordo com Sambrook et al. (2001). Os clones positivos foram confirmados por análise de PCR, usando-se oligonucleotídeos *cry1IaF* e *cry1IaR* e o programa descrito acima. O clone positivo pGEMCry1Ia foi seqüenciado pelo laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Brasília - UnB, em seqüenciador MEGA BACE 1000 da Amersham Bioscience. O seqüenciamento foi realizado nas duas fitas de DNA utilizando os oligonucleotídeos descritos na tabela 1 e figura 2. Depois de confirmadas, as sequências foram alinhadas e submetidas à análise por BLAST. (NATIONAL..., 2005).

Tabela 1 – Lista dos oligonucleotídeos usados no trabalho.

Oligonucleotídeo	Seqüência	Utilidade
Cry1IaF	5'GTATAAGTGGAGGGATCCATATG3'	PCR/Sequenciamento
Cry1IaR	5'GGATCCCTACATGTTACGCTT3'	PCR/Sequenciamento
Cry1Ia F1	5' TTTTGGAAAAGAGTGGGG 3'	Sequenciamento
Cry1Ia F2	5' ACTGAATCATTGGCAGGG 3'	Sequenciamento
Cry1Ia F3	5' ACCTTTAGAACTGTAGGC 3	Sequenciamento/RT-PCR
Cry1Ia R1	5' CTTTGTACATCTAAAAAGC 3'	Sequenciamento
Cry1Ia R2	5' TGAAGACAGATTGAAAGC 3'	Sequenciamento
Cry1Ia R3	5' GGTGCATTATTATTATACC 3'	Sequenciamento
Cry1Ia R4	5' GCATAAGTTGATATTTTTTG 3'	Sequenciamento
Universal	5'GTAAAACGACGGCCAGT3'	Sequenciamento
Reverso	5'GGAAACAGCTATGACCATG3'	Sequenciamento
T1	5'CCTGCAGGATCCTTAGGTTTTTTTTTTTTTTTTT3'	Síntese de cDNA
T2	5'-CCTGCAGGATCCTTAGGTT-3'	Síntese de cDNA/ RT-PCR

Os clones positivos foram digeridos (digestão parcial) com enzima de restrição *Eco* RI, seguindo as instruções do fabricante (Amersham). O resultado da digestão (fragmento de aproximadamente 2,1 kb) foi separado por eletroforese em gel de agarose a 0,8%. A banda referente ao gene *cry1I* foi eluída do gel, utilizando-se o kit Sephaglas™ Bandprep Kit (Pharmacia) seguindo as recomendações do fabricante.

3- Construção, purificação e análise do baculovírus recombinante.

O fragmento de 2,1 kb purificado foi clonado no vetor pSynXIVX3+ (WANG et al., 1991), previamente digerido com a enzima de restrição *Eco* RI, formando, assim, o plasmídeo recombinante pSynBtCry1Ia, que foi utilizado para a construção do baculovírus recombinante (Figuras 1 e 3). Um µg de DNA do plasmídeo recombinante (pSynBtCry1Ia) e 0.5 µg do DNA do vírus vSyngalVI-, previamente linearizado com a enzima de restrição *Bsu* 36I, foram co-transfectadas em monocamadas de células BTI-Tn5B1-4 (1x10⁶

células) em placas de 60 mm, usando lipossomos (Cellfectin[®], Invitrogen). As placas foram incubadas por uma semana a 27 °C, até a visualização dos corpos de oclusão, quando o sobrenadante foi coletado e usado para purificação do vírus recombinante por diluição seriada em placa de 96 poços (O'REILLY et al., 1992). O genoma do vírus vSyngalVI- possui um único sítio para a enzima *Bsu* 36I, situado dentro do gene da β -galactosidase, a linearização do vírus o torna não infectivo, facilitando a purificação do vírus recombinante. O plasmídeo recombinante pSynBtCry1Ia possui além do gene *cry1Ia*, o gene da poliedrina, que também produz oclusões cristalinas, facilitando a purificação viral. Três ciclos de purificação em placa de 96 poços foram necessários para a purificação do vírus recombinante e a sua identificação se deu pela presença de corpos de oclusão no núcleo das células infectadas. O vírus recombinante (denominado de vSynBtCry1Ia) foi amplificado em células BTI-Tn5B1-4, purificado e seu DNA extraído e analisado por PCR, para confirmação da inserção do gene *cry1Ia*, como descrito em O'Reilly et al. (1992).

4 – Análise transcricional do gene *cry1Ia* expresso em células de inseto: Setenta e duas horas pós-infecção (h.p.i.), o RNA viral foi purificado a partir de 1,5 mL de células BTI -Tn5B1-4 (1×10^6 / placa de 60 mm), infectadas com 10 pfu (unidade formadora de placa)/célula do vírus recombinante vSynBtCry1Ia, usando-se o reagente Trizol[®] e seguido as instruções do fabricante. (Invitrogen). O c-DNA foi sintetizado usando o oligonucleotídeo T1 (tabela 1) (RODRIGUES et al., 2001), e o Kit M-MLV-RT, seguindo as instruções do fabricante (Invitrogen). A partir do cDNA obtido, foi feita uma reação de PCR para amplificar o cDNA correspondente com o RNA mensageiro do gene. Para isto, foi utilizado um oligonucleotídeo específico para o gene *cry1Ia*, o Cry1IaF3 (tabela 1) e o T2, que é complementar ao T1 (RODRIGUES et al., 2001). Para a reação de PCR foram utilizados 5 μ L do tampão 10 X da enzima Taq DNA polimerase (Pharmacia), 2 μ L da mistura dos quatro dNTPs (10 mM cada), 2 μ L de cada um dos oligonucleotídeos (a 10 μ M), 2 μ L do cDNA respectivo, uma unidade da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen) e água "Milli-Q" para um volume final de 50 μ L. O programa da PCR utilizado para a amplificação foi: 94°C/5 min, 30 ciclos de 95°C/1min, 54°C/1min e 30 s, 72°C/1min e 30 s uma extensão final de 72°C/7 min. Os produtos das reações de PCR foram analisados em géis de agarose a 1,5%.

Para confirmação da especificidade do fragmento obtido, o mesmo foi eluído do gel, utilizando-se o kit SephaglasTMBandprep Kit (Pharmacia), seguindo as

recomendações do fabricante, digerido com enzima de restrição *Eco RI* (Amersham) e analisado por eletroforese em gel de agarose a 1,0%.

5 – Produção de anti-soro policlonal contra Cry1I: O soro imune foi preparado utilizando uma cobaia (coelho macho) de 3 meses de vida, ao qual foi inoculada subcutâneamente com 300 μ L de solução contendo a proteína Cry1Ia (65 kDa) como antígeno. A solução contendo a proteína Cry1Ia foi obtida a partir de uma banda correspondente à proteína em um gel de SDS-PAGE 12%. Após a eletroforese, a banda foi retirada do gel e homogeneizada em 200 μ L de tampão PBS 1X com auxílio de um homogenizador (Homogenizer Glas-Col). Primeiramente, coletou-se uma alíquota de soro pré-imune para testes posteriores. Foram feitas três imunizações com intervalos de 15 dias segundo protocolo descrito por Harlow e Lane (1988) e em todas as imunizações utilizou-se 200 μ L da proteína homogeneizada em PBS 1X. Decorridos 40 dias da primeira imunização, foram coletados cerca de 10 mL de sangue arterial por meio de punção cardíaca, o soro foi obtido por centrifugação do material a 5.000 x *g* por 20 min e estocado em alíquotas com 50% de glicerol a -20 °C. (HARLOW; LANE, 1988; SAMBROOK et al., 2001).

6 – Análise da expressão da proteína Cry1Ia: Células BTI-Tn5B1-4 (10⁶ células) foram infectadas separadamente com os vírus vSyngalVI-, AcMNPV, vAcBtm e vSynBtCry1Ia (10 pfu/célula), e a 72 h.p.i., transferidas para tubo de microcentrifuga e centrifugadas a 5000 x *g* por 5 min. O sobrenadante foi descartado e ao sedimento de células foram adicionados 100 μ L de tampão de amostra de proteína com 50% de β -mercaptoetanol® e incubadas 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% de metanol e 10% de ácido acético e Comassie blue 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. O outro foi utilizado para transferência das proteínas para uma membrana de PVDF (Millipore), para o experimento de imuno-deteção (“Western-blot”), de acordo com Harlow e Lane (1988). As proteínas foram transferidas para membrana de PVDF, usando-se o aparato de transferência da Bio-Rad (Trans-Blot® SD – Semi Dry Transfer Cell), de acordo com o protocolo do fabricante. A membrana foi bloqueada com 3% de albumina 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. Foram

analisados, também, extratos de larvas de *S. frugiperda* (120 h p.i.) infectadas com o vírus vSynBtCry1Ia e não infectadas.

7 – Bioensaio com a proteína recombinante: Larvas de terceiro instar de *S. frugiperda* (1.500) foram infectadas através de aplicação de injeção subcutânea contendo cerca de 10 µL do vírus recombinante vSynBtCry1Ia (10^8 pfu/mL). Após cinco dias, as larvas foram homogeneizadas em 1 mL de água para cada 10 larvas. O homogeneizado foi filtrado em lã de vidro e a suspensão foi centrifugada a $10.000 \times g$ por 30 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspensionado em uma solução de 100 mM de EDTA, 40mM de EGTA e 1,0 mM de PMSF. A dosagem de proteína foi feita com o reagente Bradford da Bio Rad (BRADFORD, 1976). Como havia tanto cristais da proteína Cry1Ia como poliedros (oclusão protéica contendo vírus característica dos baculovirus) na suspensão, um gel de poliácridamida foi montado contendo 15 µL da suspensão e analisado por eletroforese. Após a eletroforese, o gel foi corado como descrito acima e a banda protéica referente à proteína Cry1Ia foi quantificada proporcionalmente em relação às proteínas da solução usando o aparelho Scanner (Genius Colorpage-vivid 4) e o programa Image Phoretix 2D (Pharmacia).

O bioensaio contra larvas neonatas de *A. grandis* foi realizado incorporando-se a proteína recombinante a 10 mL de dieta artificial como descrito por Martins et al. (2001) e, em seguida, a dieta foi vertida em placa de Petri (15 mm x 20 mm). Após solidificação da dieta, foram feitos 25 furos. Em cada furo foi colocada uma larva neonata. Foram testadas cinco doses (100 µg/mL, 50 µg/mL, 20 µg/mL, 10 µg/mL e 05 µg/mL) e mais um controle. O bioensaio foi mantido em câmara de incubação com fotofase de 14/10h e a uma temperatura de 27°C. Uma semana após, fez-se a leitura do bioensaio e se determinou a CL_{50} , através de análise de Probits (FINNEY, 1971). Para comparação dos resultados obtidos, foram feitos ensaios com a linhagem S1122 de *B. thuringiensis tenebrionis* (Btt), que é a linhagem padrão tóxica para insetos da ordem Coleoptera. Para o ensaio com a essa linhagem, foi utilizada a cultura total, já que a proteína Cry1Ia não cristaliza e provavelmente se perderia durante a purificação dos cristais. A preparação da estirpe S1122 foi feita segundo Praça et al. (2003). Depois do processamento da amostra, realizou-se a dosagem de proteína total com o reagente Bradford da Bio Rad (BRADFORD, 1976).

O bioensaio contra larvas de *S. frugiperda* foram feitos de acordo com protocolo descrito por Praça et al. (2003). Para tal, foram preparadas dez doses seriadas (10^{-1} a 10^{-10}), sendo que a primeira dose possuía uma concentração de 20 µg de proteína/mL da

proteína recombinante e da estirpe S1450 (Btk), que é a estirpe padrão para insetos da ordem Lepidoptera. Os dados de mortalidade obtidos foram analisados através de Probits (Finney, 1971) e a concentração letal (CL₅₀) foi determinada. A estirpe S1450 foi processada da mesma forma que a S1122.

8 – Análise estrutural de prováveis cristais da proteína recombinante Cry1Ia: Cristais oriundos do extrato de *S. frugiperda* infectadas com o vírus recombinante vSynBtCry1I Foram fotografados em um microscópio Leica MPS 60, com contraste de fases. Para microscopia eletrônica de varredura, 100 µL do homogeneizado de extrato de lagartas de *S. frugiperda* infectadas com o vírus vSynBtCry1I, foi centrifugado a 10.000 x g, o sobrenadante descartado e o sedimento depositado sobre suportes metálicos. 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.

9 – Análise ultraestrutural de intestinos de *A. grandis* inoculadas com a proteína recombinante Cry1Ia: Quinze larvas de quarto instar de *A. grandis* foram alimentadas com dieta artificial contendo 115 µg de proteína recombinante Cry1Ia por mL de dieta. As larvas foram coletadas com 24, 48 e 72 horas após ingestão da dieta e os intestinos removidos, fixados e processados para microscopia eletrônica de transmissão segundo protocolo descrito por Bozzola e Russel, (1992). Foram feitos cortes de 80 nm em ultramicrotomo automático Leica ultracut UCT e montados em tela de níquel de 200 mesh. As amostras foram visualizadas em microscópio eletrônico de transmissão Jeol 1011 e as imagens foram obtidas através do programa GATAN Bio Scan câmera, model 792.

10 – Modelagem da proteína Cry1Ia: A sequência do gene *cry1Ia* foi submetida a uma tradução e, posteriormente, foi avaliada para modelagem através de homologia, com auxílio de ferramentas de bioinformática. (CBS, 2005). Foram obtidas quatro possíveis estruturas de proteínas, para que servissem de base à modelagem. A proteína Cry3A código PDB 1DLC foi escolhida por se tratar do modelo mais realístico (EUROPEAN..., 2005). Com base nesta estrutura, o modelo teórico para a proteína Cry1Ia foi construído. Além disso, foi feito o Plot de Ramachandran, para checagem do modelo proposto (<http://www.raven.bioc.cam.ac.uk/rampage2.php>).

Resultados

1 – Clonagem e sequenciamento do gene *cry1Ia*: Oligonucleotídeos específicos (tabela 1) foram usados para a amplificação do gene *cry1Ia* (dados não mostrados) em uma reação de PCR a partir do DNA da estirpe de *Bacillus thuringiensis* S1451. O fragmento amplificado de 2,1 pKb foi, então clonado no vetor pGEM-T easy, originando o plasmídeo pGEMBtcry1Ia. (dados não mostrados) e sequenciado. A análise do sequenciamento revelou que este gene possui uma ORF de 2.196 pb que potencialmente codifica para uma proteína de 731 aminoácidos (fig. 1) possuindo 99% de identidade com a sequência do gene *cry1Ia* descrita por Taylor et al. (1992) (Genbank acesso .X62821). Apenas cinco nucleotídeos diferentes foram encontrados ao longo de sua sequência. Três das cinco diferenças de nucleotídeos resultaram na mudança de três aminoácidos (K514N, N578S e F602S) na sequência da proteína (Fig. 2), sendo que, as outras duas mutações não implicaram em mudança do aminoácido.

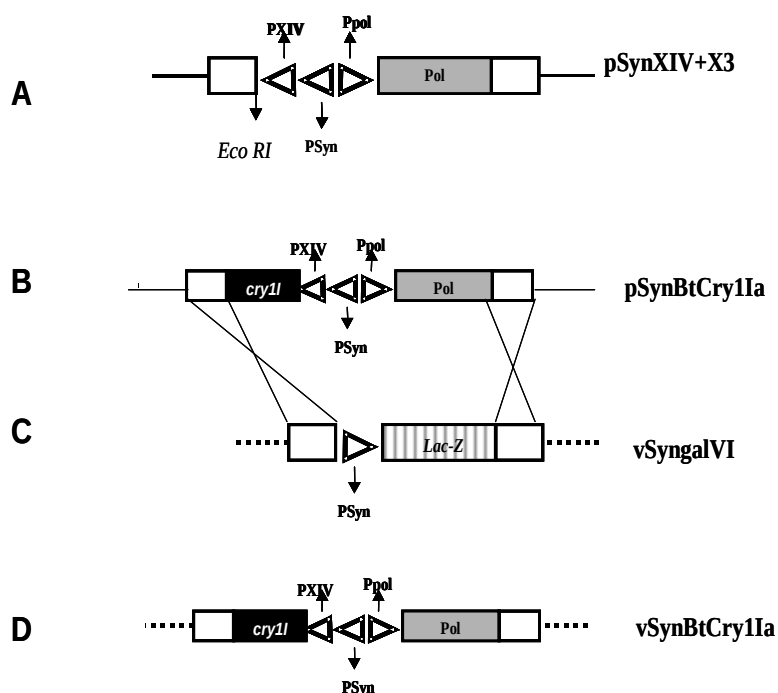


Figura 1 – Esquema mostrando o locus do gene da poliedrina nos plasmídeos pSynXIVX3+, pSynBtCry1Ia e vírus vSyngalVI e vSynBtCry1Ia. O plasmídeo pSynXIV+X3 foi usado para clonagem do gene *cry1Ia* no sítio de *Eco RI* formando o plasmídeo pSynBtCry1Ia que foi co-transfectado em células de inseto, juntamente com o DNA do vírus vSyngalVI- para construção do vírus recombinante vSynBtCry1Ia. Os genes **Pol** (poliedrina), *lac-Z* (b-galactosidase) e *cry1Ia* estão indicados na figura. Além disso, os promotores **PXIV**, **Ppol** e **PSyn**, que controlam a expressão desses genes também estão indicados na figura.

ECORI M K L K N Q D K H Q S F S S N A K V D K I S T D S L K N
 -36 **gaattc**actagtagtattgataa**gtggaggatccat**atgaaactaaagaatcaagataagcatcaaagttttcttagcaatgcgaagtagataaaatctctacggattcactaaaaat 84
 E T D I E L Q N I N H E D C L K M S E Y E N V E P F V S A S T I Q T G I G I A G
 87 gaaacagatatagaattacaacattaatcatgaagattgtttgaaatgtctgagtagtgaatgtagagccgtttgttagtgcacacaattcaaacaggtattggtattgcgggt 204
 K I L G T L G V P F A G Q V A S L Y S F I L G E L W P K G K N Q W E I F M E H V
 205 aaaactacttgtagcctaggcggtctcttttcaggacaaagtagctagctttatagttttatcttaggtgagctatggcctaaggggaaaaatcaatgggaaatctttatggaacatga 324
 E E I I N Q K I S T Y A R N K A L T D L K G L G D A L A V Y H D S L E S W V G N
 325 gaagagattattaatcaaaaaatcaacttatgcaagaataaagcacttacagacttgaaaggattaggagatgccttagctgtctaccatgattcgcttgaaagttgggttggaaat 444
 R N N T R A R S V V K S Q Y I A L E L M F V Q K L P S F A V S G E E V P L L P I
 445 cgtaataacacaagggttaggagttgttcaagagccaatatatcgcatgaattgatgttcgttcagaaactaccttcttttcaggtgtctggagagggtaccattattaccgata 564
 Y A Q A A N L H L L L L R D A S I F G K E W G L S S S E I S T F Y N R Q V E R A
 565 tatgcccaagctgcaaatattacattttgttctattagagatgcattcttttggaaaagagtggtgattatcatcttcagaaattcaacattttataaccgtcaagtcgaacgagca 684
 G D Y S D H C V K W Y S T G L N N L R G T N A E S W V R Y N Q F R R D M T L M V
 685 ggagattattccgaccattgtgtgaaatggtagacaggtctaaataacttgagggtacaaatgccgaagttgggtacgataataatccgtagagacatgactttaatggta 804
 L D L V A L F P S Y D T Q M Y P I K T T A Q L T R E V Y T D A I G T V H P H P S
 805 ctgatttttagtgccactatttccaagctatgatacaaatgtatccaacttaaacactacgcccaacttaagagaagtagatatacagagcgaatttggtacagatcacatccgcatccaagt 984
 F T S T T W Y N N A P S F S A I E A V V R N P H L L D F L D F L Q V T I Y S L L
 985 tttaacagtagcagcttggtaataataatgcaccttcgttctctgcatagaggctgctgtgttcgaaacccgcatctactcgattttctagaacaagttacattttacagcttatta 1104
 S R W S N T Q Y M N M W G G H K L E F R T I G G T L N I S T Q G S T N T S I N P
 1105 agtcgtaggagtaacactcagtagtatgaatatgtgggaggacataaactagaattccgaacaatagggaacgttaaatatctcaacacaaggtactactaatcttattatcct 1224
 V T L P F T S R D V Y R T E S L A G L N L F L T Q P V N G V P R V N I D F H W K F V
 1225 gtaacattaccgcttacttctcgagacgtctataggaactgaatcatttttaactcaacgtgttaatggagtagctagggtgattttcatgggaattcgctc 1344
 T H P I A S D N F Y Y P G Y A G I G T Q L Q D S E N E L P P E A T G Q P N Y E S
 1345 acacatccgtagcctatgataattttctattatcca6ggtatgctggaattgggagcgaattacagagattcagaaaatgaattaccacgtgaagcaacaggacagccaaattatgaatct 1464
 Y S H R L S A S H V K A L V Y S W T H R S A D R T N I E P N S I T
 1465 tatagtcagtagattatctcatataggactatcttcagcatcacatgtgaaagcattgggtatattcttgagcagcatgtagtcagatcgtaacaatacaattagagccaaatagcattaca 1584
 Q I P L V N A F N L S S G A A V V R G P G F T G G D I L R R T N T G T F G D I R
 1585 caaataccattagtaaa**Tgctttcaatctgtcttc**aggtgcgcgtgtagtgagaggaccaggtttacaggtggggatattccttcgaagaacgaatactggtacatttggggatatacga 1704
 V N I N P P F A Q R Y R V R I R Y A S T T D L Q F H T S I S G K A I N Q G N F S
 1705 gtaaatattaatccaccatttgcacaaagatcgctgtagggttcgctatgcttctaccagagattacaattccatacgtcaatta6cggtaagctattaatcaaggtaatttttca 1824
 A T M N R G E D L D Y K T S R T V G G F T T P F S F L D V Q S T F T I G A W N F S
 1825 gcaactatgaatagaggagagacttagactataaa**acctCtagaactgtagg**ctttaccactccatt**tagcttttttagatgtacaag**tacattcacaataggtgcttggaaacttctct 1944
 S G N E V Y I D R I E F V P V E V T Y E A E Y D F E K A Q E K V T A L F T S T N
 1945 tcaggtaacgaagtttatatagatagaattgaatttgttcggtagaagtaacatagggcagaatattgatttgaaaaagcgcaagagaaggttactgcactgtttacattacagaa 2064
 P R G L K T D V K D Y H I D Q V S N L V E S L S D E F Y L D E K R E L F E I V K
 2065 ccaagaggattaaaaacagatgttaaaggattatcatattgaccaggtatcaaaatttagtagagctctcatcagatgaattctattcttgatgaaaagagagaattatttcgagatagtttaa 2184
 Y A K Q L H I E R N M * BamHI ECORI
 2185 tacgcgaa6caactccatattgagcgtaacatgtaggatccaatcgaattc
 Cry1IaF Cry1IaR4 Cry1IaF1 Cry1IaF2 Cry1IaR3 Cry1IaR2 Cry1IaF3 Cry1IaR1

2236

Figura 2 – Sequência completa do gene *cry1Ia*. Os oligonucleotídeos Cry1IaF, Cry1IaF3e Cry1IaR que se anelam nas posições 17-39, 1837-1854 e 2182-2212, respectivamente, estão indicados na figura. Os nucleotídeos e os aminoácidos (K514N, N578S e F602S) que se diferem da sequência padrão do gene *cry1Ia*, depositada no Genbank (acesso n.ºX62821), Tailor et al. (1992), estão mostrados em negrito. Os oligonulceotídeos Cry1aF1, Cry1aF2, Cry1aR1, Cry1aR2, Cry1aR3 e Cry1aFR4 que foram usados para o sequenciamento do gene *cy1Ia* estão também mostrados na figura. Em itálico estão os aminoácidos, correspondentes a sequência original descrita por Tailor et al. (1992). Os asteriscos indicam os códons ATG e TGA, que correspondem, respectivamente, aos códons de iniciação e de terminação do gene *cry1Ia*. A ORF deste gene é formada por 2196 nucleotídeos. que correspondem a 731 aminoácidos.

2 – Construção e purificação do baculovírus recombinante vSynBtCry1Ia: O gene *cry1Ia* foi removido do plasmídeo pGEMBtcry1Ia e clonado no vetor de transferência pSynXIVX3+ (fig.1), ficando sob comando do promotor da poliedrina modificado (PXIV) (WANG et al., 1991). O vetor de transferência foi co-transfectado com o DNA do vírus vSynGalVI- (fig. 1) em células de inseto e posteriormente, o vírus recombinante

vSynBtCry1Ia (fig. 1) foi purificado. O vírus vSynBtCry1Ia expressa a proteína Cry1Ia ao mesmo tempo em que expressa a poliedrina. Logo, a purificação do vírus recombinante se deu pela observação de poliedros nas células infectadas com o sobrenadante da co-transfecção e das diluições em placas de 96 poços (dados não mostrados).

3 – Análise transcricional do gene *cry1Ia* expresso em células de inseto: RNA total de células de inseto infectadas (72 h p.i.) com o vírus vSynBtCry1Ia foi usado em uma reação de RT-PCR com oligonucleotídeos específicos para a cauda poli-A e para o gene *cry1Ia* e obtido um fragmento de aproximadamente 475 pb (fig. 3), correspondente a 375 pb do gene, mais 100 pb provavelmente derivada da cauda poli-A. A análise de restrição do fragmento de RT-PCR com a enzima *Eco* RI confirmou ser este um fragmento correspondente ao gene *cry1Ia*, gerando dois novos fragmentos um de aproximadamente 281 pb e outro de 194 pb (Fig. 3).

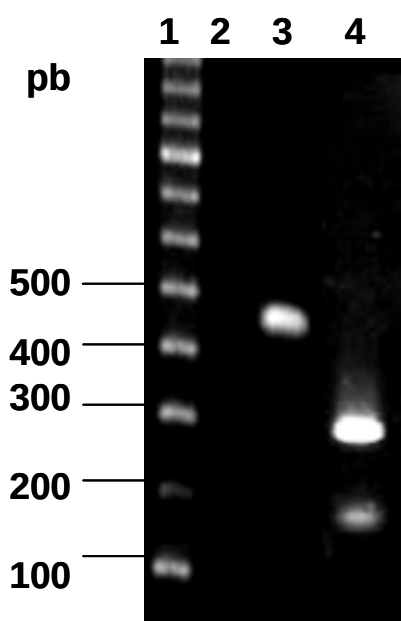


Figura 3 – Eletroforese em gel 1,0% com produto de amplificação de RT-PCR do gene *cry1Ia* com os oligonucleotídeos cry1IaF3 e T2 (poços 2 e 3): 1- Marcador 100 bp DNA Ladder (Amersham), 2- controle (sem DNA), 3- cDNA (*cry1Ia*), 4- digestão da banda correspondente ao gene *cry1Ia* da RT-PCR com enzima *Eco* RI. A seta indica o fragmento de aproximadamente 450 pb correspondente à região 3' do gene *cry1Ia*. A especificidade do fragmento amplificado é mostrada no poço 4, onde a digestão do fragmento de 450 pb gerou um fragmento de aproximadamente 281 pb, que é a distância entre o oligonucleotídeo cry1IaF3 e o sítio de *Eco* RI que está localizado a 281 b do mesmo, perto do final do gene.

4 – Análise da expressão da proteína Cry1Ia em gel de poliacrilamida SDS-PAGE e Imuno-deteccção: Células de inseto e insetos foram infectadas com diferentes vírus recombinantes e os extratos foram analisados a 72 h p.i. e 120 h p.i, respectivamente, por SDS-PAGE e imunodeteccção com um anticorpo anti-Cry1Ia. O gel de SDS-PAGE e a imuno-deteccção revelaram a presença de uma banda de aproximadamente 65 kDa em extratos de insetos infectados com o vírus recombinantes.

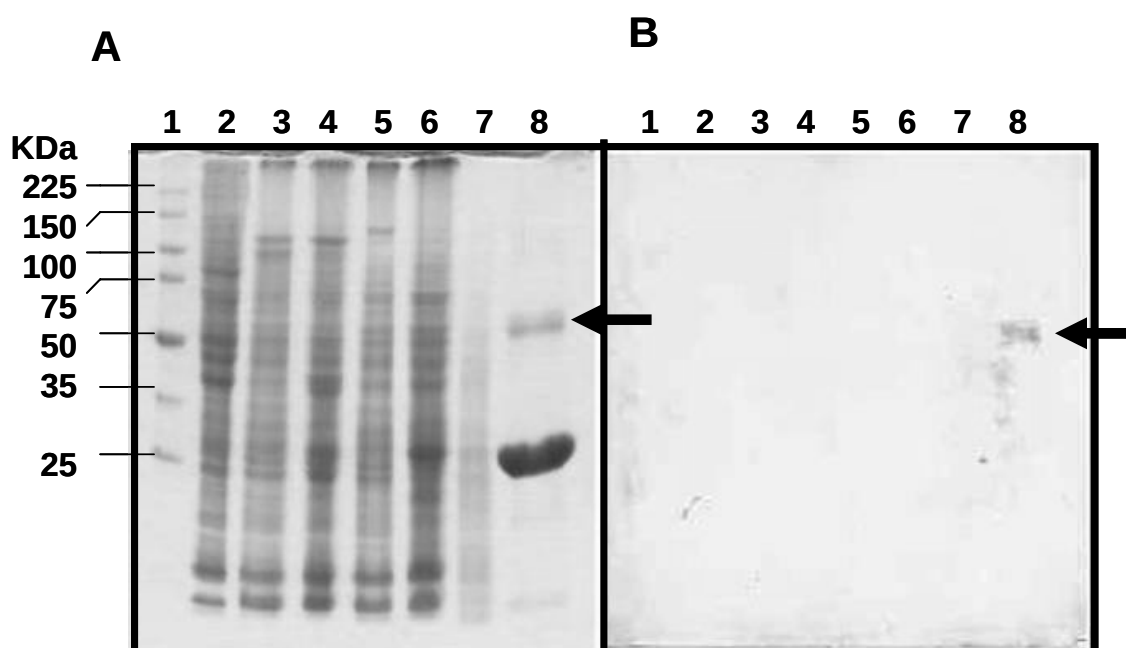


Figura 4: Análise da expressão da proteína Cry1Ia: (A) SDS-PAGE a 12%: 1 Marcador (Promega), 2 – Extrato de células BTI-Tn5B1-4 mock (não infectadas), 3 – Extrato de células BTI-Tn5B1-4 infectadas com vSynGal, 4 – Extrato de células BTI-Tn5B1-4 infectadas com AcMNPV, 5 – Extrato de células BTI-Tn5B1-4 infectadas com vAcBtm, 6 – Extrato de células BTI-Tn5B1-4 infectadas com vSynBtCry1Ia, 7 – Extrato de larva de *S. frugiperda* não infectada, 8 – Extrato de *S. frugiperda* infectada com vSynBtCry1Ia. (B) Immunoblotting com antisoro anti-Cry1Ia. 1 Marcador (Promega), 2 – Extrato de células BTI-Tn5B1-4 mock (não infectadas), 3 – Extrato de células BTI-Tn5B1-4 infectadas com vSynGal, 4 – Extrato de células BTI-Tn5B1-4 infectadas com AcMNPV, 5 – Extrato de células BTI-Tn5B1-4 infectadas com vAcBtm, 6 – Extrato de células BTI-Tn5B1-4 infectadas com vSynBtCry1Ia, 7 – Extrato de larva de *S. frugiperda* não infectada, 8 – Extrato de *S. frugiperda* infectada com vSynBtCry1Ia. Setas indicam a proteína de 65 kDa nos extratos de *S. frugiperda* infectada com o vírus vSynBtCry1Ia.

5 – Bioensaio com proteína recombinante Cry1Ia: Larvas neonatas de *A. grandis* foram colocadas, separadamente em dieta artificial contendo várias quantidades de proteína recombinante Cry1Ia e uma semana depois, a CL₅₀, foi determinada (tabela 2).

Tabela 2 – Determinação da CL₅₀ da proteína recombinante Cry1Ia contra *Anthonomus grandis*. A tabela mostra o resultado de três diferentes ensaios e resultados de CL50 da proteína Cry1Ia contra *A. grandis*, com base em três repetições. Sendo n: número de indivíduos testados e CL50: concentração letal para 50% da população

Strain	n	CL ₅₀ (mg/mL)	n	CL ₅₀ (mg/mL) ^a
Cry1Ia	25	0,023 (0,017-0,03) ^b		
	25	0,024 (0,017-0,036)	75	0,0215 (0,017 – 0,026)
	25	0,017 (0,012-0,025)		
S1122 (Btt)	25	0,222 (0,029-0,446)		
	25	0,465 (0,328-0,636)	75	0,328 (0,230 – 0,440)
	25	0,376 (0,236-0,551)		

a resultados de CL50 da proteína Cry1Ia contra *A. grandis*, com base em três repetições

b Números entre parênteses referem-se ao intervalo de confiança a 95%.

Os resultados obtidos indicam que a toxina do recombinante foi cerca de 15 vezes mais tóxica que a estirpe padrão para insetos da ordem Coleoptera comparando-se a mesma quantidade de proteína total. Foi testada também a atividade de poliedros do vírus selvagem AcMNPV (dados não mostrados), que não demonstrou atividade contra o bicudo do algodoeiro, indicando não serem os poliedros os responsáveis pela patogenicidade ao inseto. A toxina também foi testada contra *Anticarsia gemmatilis*, *Plutella xylostella* (dados não mostrados) e *Spodoptera frugiperda*, para avaliar sua atividade contra insetos da ordem Lepidoptera, para os dois primeiros insetos a toxina não se mostrou toxicidade. Já para *S. frugiperda*, os resultados foram bastante significativos, a

CL₅₀ foi de até 160 vezes menor quando comparado à linhagem padrão para insetos da ordem Lepidoptera (Btk), que também possui a proteína Cry1Ia (tabela 3).

Tabela 3 – Determinação da CL₅₀ da proteína recombinante Cry1Ia contra *Spodoptera frugiperda*. A tabela mostra o resultado de três diferentes boensaiois da proteína Cry1Ia contra *S. frugiperda*, com base em três repetições . Sendo n: número de indivíduos testados e CL₅₀: concentração letal para 50% da população

Strain	n	CL ₅₀ (µg/mL)	n	CL ₅₀ (µg/mL) ^a
Cry1Ia	24	0,312 (0,020-8,774) ^b		
	24	0,125 (0,004-3,062)	72	0,0289 (0,032 – 3,310)
	24	0,533 (0,437-17,371)		
Btk	24	2,124 (1,076-3,74)		
	24	5,088 (0,927-19,065)	72	3,457 (0,711-15,08)
	24	0,132 (0,101-22,456)		

a resultados de CL₅₀ da proteína Cry1Ia contra *A. grandis*, com base em três repetições

b Números entre parênteses referem-se ao intervalo de confiança a 95%.

6 – Análise estrutural de prováveis cristais da proteína recombinante Cry1Ia

Extrato de larvas de *S. frugiperda* infectadas com o vírus recombinante vSynBtCry1Ia foram analisados por microscopia de luz comum (fig. 5A) e eletrônica de varredura (fig. 5B), mostrando a presença de grandes cristais cubóides de vários tamanhos, provavelmente derivados da cristalização da proteína recombinante Cry1Ia.

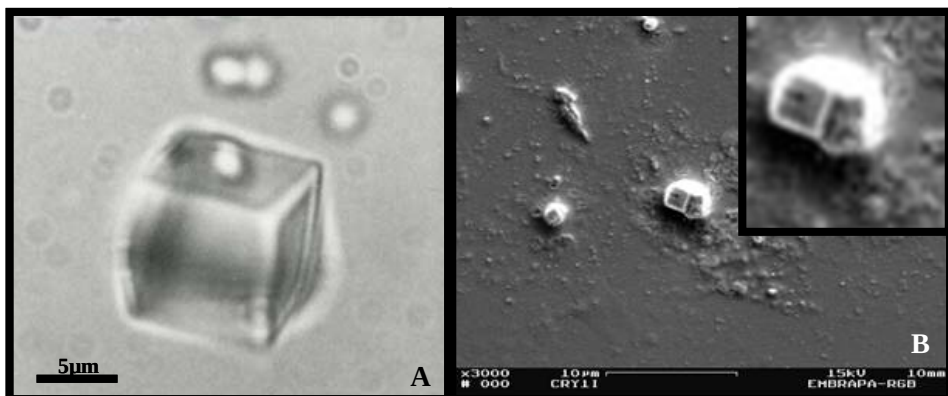


Figura 5: Análise estrutural de cristais presentes em larvas de *S. frugiperda* infectadas com o vírus recombinante vSynBtCry1Ia. A. Microscopia de contraste de fase mostrando um provável cristal da proteína Cry1Ia formado em larvas de *S. frugiperda*; B. Microscopia eletrônica de varredura dos prováveis cristais (seta) formados pela proteína Cry1Ia, mostrando no detalhe os cristais, em formato cubóide.

6.1 – Análise ultraestrutural de intestinos de *A. grandis* inoculadas com a proteína recombinante Cry1Ia: A proteína recombinante Cry1Ia foi altamente tóxica para as células do intestino de *A. grandis*, destruindo a integridade celular e as microvilosidades (fig. 6), não sendo possível a identificação de organelas citoplasmáticas, tais como mitocôndrias mostrando o efeito citotóxico dessa proteína.

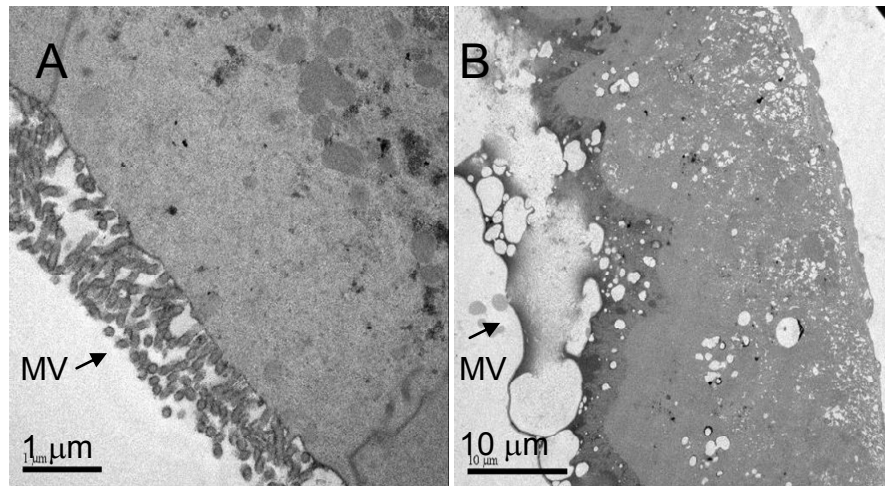


Figura 6 – Efeito tóxico da proteína recombinante Cry1Ia no intestino de *A. grandis*. A, Intestino de larva *A. grandis* controle, sem tratamento com a proteína Cry1Ia. B, Intestino de larva alimentada com dieta artificial contendo 115 µg/mL da proteína Cry1Ia (48 h pós-inoculação). MV, microvilosidadess.

7 – Modelagem da proteína Cry1Ia: A figura 7A mostra o modelo teórico proposto para a proteína Cry1Ia evidenciando a região N-terminal localizada no domínio I da proteína e a região C-terminal, localizada no domínio III da proteína. Na figura 7B verifica-se em detalhe, o domínio I formado por sete α -hélices, sendo seis anfipáticas e a central hidrofóbica. O domínio III é mostrado detalhadamente na figura 7C. Nela observa-se que estão localizados os três aminoácidos que se diferem da seqüência padrão o gene *cry1Ia*, descrita por Tailor et al. (1992). O modelo teórico para proteína Cry1Ia (Fig. 7A) foi feito com base na proteína Cry3A, por ter se demonstrado o modelo mais realístico. Após a modelagem, foi construído um Plot de Ramachandran (dado não mostrado), que apontou o modelo como sendo favorável por possuir 89,6% de resíduos favoráveis, 6,7% de resíduos em regiões permitidas e 3,7% de resíduos desfavoráveis.

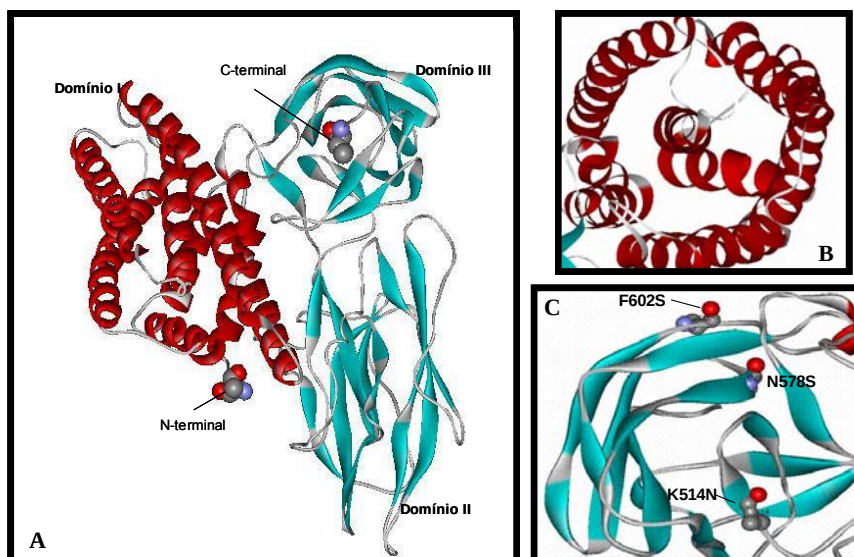


Figura 7: A – Estrutura tridimensional (modelo teórico) para a proteína Cry1Ia, produzida por modelagem molecular por homologia a partir da δ -endotoxina Cry3A código PDB 1DLC. Visualizada através do programa WebLab ViewerLite 3.7 da Molecular Simulations Inc; B - Detalhe do domínio I da proteína Cry1Ia, mostrando as sete α -hélices, sendo seis anfipáticas e a central hidrofóbica; C - Detalhe do domínio III da proteína cry1Ia, mostrando os três pontos de mutação nos resíduos de aminoácidos, nas posições K514N, N578S e F602S da proteína Cry1Ia relativos à sequência descrita neste trabalho.

Discussão:

O gene *cry1Ia* da estirpe brasileira de *B. thuringiensis* S1451 foi clonado e seqüenciado. A seqüência do gene revelou uma identidade de 99% com relação a seqüência do gene *cry1Ia*, depositada no Genbank (acesso X62821), Tailor et al. (1992).

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. Por isso, não pode ser acumulada nem detectada na célula após o estágio T5 da esporulação (TOUNSI et al., 2003; SONG et al., 2003).

Em algumas estirpes de *B. thuringiensis*, o gene *cry1Ia* pode ser detectado por PCR, entretanto, nem seu transcrito, nem a proteína são detectados. Alguns estudos demonstraram que este gene pode estar silenciado em certas estirpes de *B. thuringiensis* por estar localizado a jusante a genes *cry1* e um forte terminador transcricional pode está

presente no intervalo de seqüências dos genes *cry1* e *cry1I* (SONG et al., 2003; SHIN et al., 1995; GLEAVE et al., 1993; TAILOR et al., 1992).

A maioria dos genes de *B. thuringiensis* são transcritos por um ou ambos promotores *Btl* ou *BtII*, dependendo do estágio de esporulação. Tounsi et al. (2003), demonstraram em seus trabalhos que existe uma região promotora isolada para o gene *cry1Ia* para uma estirpe de *B. thuringiensis* sub. *kurstaki*. Eles verificaram que a seqüência identificada como promotora possui alta homologia com muitos promotores genes específicos de *Bacillus subtilis*, que estão sob o controle do fator de transcrição σ^E . Muitos genes *cry* de Bt estão sob o controle do fator de transcrição σ^{35} , que é homólogo ao σ^E , sugerindo que o gene *cry1Ia*, quando expresso, é transcrito por uma holoenzima $E\sigma^{35}$.

Diferentemente do que ocorre em *B. thuringiensis*, a proteína Cry1Ia expressa pelo vírus recombinante no citoplasma de células de inseto teve a capacidade de se cristalizar. Como o promotor da poliedrina modificado (pXIV) utilizado para expressão da proteína recombinante é um promotor forte, a hiper-expressão da proteína Cry1Ia pode ter contribuído para a cristalização da proteína no citoplasma celular. Além disso, algumas proteínas chaperonas podem estar sendo recrutadas para o dobramento, resultando na formação de cristais cubóides.

Quando expresso, o gene *cry1Ia* codifica uma proteína de 81 kDa, em *B. thuringiensis*. Essa proteína é uma pro - toxina e 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 (TAILOR et al., 1992; GLEAVE et al., 1993; TOUNSI et al., 2003).

A proteína cristal produzida em larvas de inseto, pelo recombinante foi detectada por SDS-PAGE como um polipeptídeo de 65 kDa, indicando que enzimas do próprio inseto podem estar clivando a proteína na porção C-terminal e, por isso, só se detectou o polipeptídeo correspondente à toxina ativa (CHOI et al., 2000; SHIN et al., 1995; GLEAVE et al., 1993).

Os experimentos de imunodeteção com o soro anti-Cry1Ia mostraram marcação na banda de 65 kDa (Figura 4B) correspondente à proteína Cry1Ia. A proteína somente foi detectada nos extratos de insetos infectados com o recombinante. Não houve marcação nos extratos de células infectadas com o vírus recombinante, provavelmente devido à

baixa concentração de proteína e à baixa concentração de anticorpo presente no soro utilizado.

Análise ultraestrutural de intestinos de *A. grandis* inoculados com a proteína recombinante Cry1Ia mostrou a resposta citopatológica das células intestinais à administração da proteína. Nas amostras controle (Fig. 6A) foi possível visualizar as microvilosidades, os núcleos bem individualizados (dados não mostrados), a presença de organelas, mostrando a organização celular. Já nas amostras tratadas (Fig. 6B), tanto em 24h (dados não mostrados), 48h e 72 h (dados não mostrados) após a ingestão de proteína, os intestinos apresentavam-se bastante danificados, não sendo possível à identificação de organelas. As microvilosidades estavam em parte destruídas e havia descolamento da membrana basal. Foi possível identificar dilatação de endomembranas.

Bauer e Pankratz (1992) descreveram em seu trabalho, o efeito da ação de *B. thuringiensis* sub. *san diego*, no intestino de larvas de *Chrysomela scripta* e descreveram mudanças morfológicas no intestino médio, muito semelhantes aos descritos neste trabalho. A análise ultraestrutural das células intestinais apresentadas no trabalho de Bauer e Pankratz (1992), revelaram a presença de grandes espaços intercelulares e intracelulares, lise dos componentes citoplasmáticos, presença de vesículas autofágicas, descolamento da membrana basal e expansão das microvilosidades.

A proteína recombinante Cry1Ia foi testada contra larvas neonatas de *A. grandis* e mostrou uma atividade inseticida significativa. Quando foi administrado a mesma quantidade de proteína recombinante e proteína total da estirpe padrão (Btt), a atividade tóxica da proteína recombinante foi cerca de quinze vezes maior. Isso pode ser explicado parcialmente pela possível menor quantidade de proteína Cry presente na preparação da estirpe padrão. Os ensaios com a estirpe padrão foram feitos com cultura total, uma vez que em estirpes de Bt, a proteína Cry1Ia não se cristaliza, 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. Os ensaios mostraram (tabela 2) que a CL₅₀ para a proteína Cry1Ia foi de 0,0215 mg/mL (G= 0,034 e $p < 0,01$), indicando ser uma proteína bastante promissora para o controle do bicudo do algodoeiro. Podendo futuramente, ter seu gene inserido em cultivares de algodão para o controle desta praga. Os testes com *A. gemmatilis* e *P. xylostella* não mostraram resultados significativos, porém quando testada contra *S. frugiperda* o resultado foi significativo. Os ensaios mostraram (tabela 3) que a CL₅₀ para a proteína Cry1Ia foi de 0,289 µg/mL (G= 0,182 e $p < 0,01$), indicando ser uma proteína bastante promissora para o controle da lagarta do

cartucho-do-milho. Assim sendo, poder-se-á construir uma cultivar de algodão que expresse a proteína Cry1Ia, que de acordo com o que foi demonstrado neste trabalho, é ativa para duas importantes pragas desta cultura.

Taylor et al., (1992), mostraram em seu trabalho que foi necessária uma dose de 195 µg/mL da toxina Cry1Ia, não-processada (polipeptídio de 81kDa), para matar 60% da população testada de *Leptinotarsa decemlineata* e 16 µm/mL foi suficiente para matar 100% da população testada de *Ostrinia nubilalis*. Shin et al. (1995), demonstraram que a proteína Cry1Ia é ativa contra *Bombyx mori* apresentando uma CL₅₀ de 10,9 µg/mL e contra *P. xylostella* uma CL₅₀ de 17,4 µg/mL. Em 2000, Choi et al., também demonstraram atividade da proteína Cry1Ia contra *B. mori* (CL₅₀ de 7,08 µg/mL) e contra *P. xylostella* (CL₅₀ de 2,57 µg/mL). Estes resultados encontrados para *P. xylostella*, se diferem dos reportados neste trabalho, provavelmente, pela diferença das populações testadas. Ainda não foi reportado na China, o aparecimento de resistência de *P. xylostella* a *B. thuringiensis*, diferente do Brasil, onde já foi detectado o aparecimento de algumas populações resistentes ao *B. thuringiensis* (CASTELO BRANCO e MELO, 2002). Uma vez que os insetos testados provêm de uma colônia formada a partir de populações de campo, pode ser que eles apresentem certa resistência a esta e outras toxinas.

A sequência da proteína Cry1Ia, deduzida a partir de sua sequência de nucleotídeos, foi usada para predição do modelo estrutural teórico (fig. 7) com base na proteína Cry3A que mostrou ser o modelo mais realístico por apresentar 39% de identidade e 584 aminoácidos em posições favoráveis (CUFF et al., 2004).

A classe de proteínas Cry3 está subdividida em quatro subgrupos, Cry3Aa, Cry3Ba, Cry3Bb e Cry3Ca. Essas toxinas apresentam massa molecular de 73 a 75 kDa (CRICKMORE et al., 2005) e produzem cristais rombóides ou cubóides. Krieg et al., (1983), descreveram a primeira estirpe produtora de gene cry3. Estas proteínas são tóxicas a insetos da ordem Coleoptera, como por exemplo, *L. decemlineata*.

Uma vez que a proteína Cry3A tenha demonstrado ser o modelo mais adequado para a dedução do modelo teórico da proteína Cry1Ia, pode ser que exista alguma relação entre as estruturas dessas duas proteínas. Essa comparação pode ser reforçada pelo fato de ambas as proteínas formarem cristais cubóides. Este evento pode estar relacionado à estrutura dessas proteínas, podendo-se deduzir, que toxinas ativas contra insetos da ordem Coleoptera tendem a formar cristais de formato cubóide ou rombóide.

O modelo teórico para a proteína Cry1Ia (fig. 7) revelou que os três aminoácidos que diferem da sequência original descrita por Tailor et al. (1992), estão localizados no domínio III da proteína, no início do *looping*, podendo interferir, positivo, ou negativamente, na ligação da proteína ao receptor da membrana do intestino médio de insetos e, conseqüentemente na toxicidade da proteína. Para confirmar se realmente esta afirmação é válida seria necessária a realização de experimentos de mutação sítio dirigida, uma vez que a deleção ou a substituição destes aminoácidos poderia indicar se a patogenicidade causada por esta toxina pode estar envolvida com tais motivos.

Referências Bibliográficas

AGRIDATA. Disponível em: < <http://www.seagri.ba.gov.br/Algodão.htm#AlgodãonoBrasil-Cultura doAlgodão> >. Acesso em: 20 out. 2002.

BAUER, L. S.; PANKRATZ, H. S. Ultrastructural effects of *Bacillus thuringiensis* var. *san diego* on midgut cells of the cottonwood leaf beetle. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 60, p. 15-25, 1992.

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

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

CASTELO BRANCO, M.; MELO, C. A. Resistência a abamectin e cartap em populações de traça-das-crucíferas. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 4, p. 541-543, 2002.

CBS. **Structural bioinformatics**. Disponível em: < <http://bioserv.cbs.cnrs.fr/> >. Acesso em: 2005.

CHOI, S. K.; SHIN, B. S.; KONG, E. M.; RHO, H. M.; PARK, S. H. Cloning of a new *Bacillus thuringiensis cry1I* – type crystal protein gene. **Current Microbiology**, New York, v. 41, p. 65-69, 2000.

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D. R.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; BRAVO, A.; DEAN, D. H. ***Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature**. Disponível em: < http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/ >. Acesso em: 20 jan 2005.

CRUZ, I.; FIGUEIREDO, M. de L. C.; MATOSO, M. J. **Controle biológico de *Spodoptera frugiperda* utilizando o parasitóide de ovos *Trichogramma***. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 1999. 40p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica, 30).

CUFF, J. A.; CLAMP, M. E.; SIDDIQUI, A. S.; FINLAY, M.; BARTON, G. J. Jpred: A Consensus Secondary Structure Prediction Server. **Bioinformatics**, Oxford, v. 14, p. 892-893, 2004.

EUROPEAN BIOINFORMATICS INSTITUTE. EMBL. Disponível em: <<http://www.ebi.ac.uk/thorntonsrv/databases/cgibin/pdbsum/GetPage.pl?template=main.html&o=PROCHECK&c=999&pdbcode=1dlc>>. Acesso em: 2005.

FEILTEISON, J. S. Novel pesticidal delta-endotoxins from *Bacillus thuringiensis*. In: ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY FOR INVERTEBRATE PATHOLOGY, 27., 1994, Montpellier, France. **Proceedings...** Montpellier, France: [s.n.], 1994. p.184.

FINNEY, D. **Probit analysis**. Cambridge: Cambridge University Press, 1971.

GLEAVE, A. P.; WILLIAMS, R.; HEDGES, R. J. Screening by polymerase chain reaction of *Bacillus thuringiensis* sorotypes for the presence of *cryV*-like insecticidal protein genes and characterization of a *cryV* gene cloned from *B. thuringiensis* subsp. *Kurstaki*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, n. 5, p.1683-1687, 1993.

GRANADOS, R. R.; GUOXUN, L.; DERKSEN, C. G.; McKENNA, K. A. A. An insect cell line from *Trichoplusia ni* (BTI-TN-5B1-4) susceptible to *Trichoplusia ni* single enveloped nuclear polyhedrosis virus. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 64, p. 260-226, 1994.

HARLOW, E.; LANE, D. **Antibodies: A laboratory manual**. [S.l.]: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.

KOSTICHKA, K.; WARREN, G. W.; MULLINS, M.; MULLINS, A. D.; CRAIG, J. A.; KOZIEL, M. G.; ESTRUCH, J. Cloning of a *cryV*-type insecticidal protein gene from *Bacillus thuringiensis*: the *cryV*-encoded protein is expressed early in stationary phase. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 178, n. 7, p. 2141-2144, 1996.

KRIEG, A.; HUGER A. M.; LANGENBRUCH, G. A.; SCHNETTER, W. *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*: ein neuer, gegenüber larven von coleopteren wirksamer pathotyp. **Zeitschrift für Angewandte Entomology**, v. 96, p. 500-508, 1983.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. **Nature**, London, n. 227, p. 680-685, 1970.

MARTINS, E. S.; PRAÇA, L. B.; MONNERAT, R. G. Caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* eficazes contra o bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis* Boheman, 1843). In: SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA AMÉRICA LATINA E CARIBE, 3., 2001, Londrina. **Anais...** Londrina: IAPAR, 2001. p. 490.

MONNERAT, R. G.; NOBRE, S. D. N.; OLIVEIRA NETO, O. B.; SCHMIDT, F. G. V.; DIAS, S. C.; LAUMAN, R.; DE SÁ, M. F. G.; SUJI, E. R. **Parâmetros bionômicos do bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis*) criado em dieta artificial para a realização de bioensaios**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2002. 22 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 29).

MONNERAT, R.G.; BRAVO, A. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Controle Biológico**. Jaguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente, 1999. p. 136-200.

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

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)**. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> >. Acesso em: 2005.

O'REILLY, D. R.; MILLER, L. K.; LUCKOW, V. A. **Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual**. New York: Freeman, 1992.

PRAÇA, L.B. **Prospecção de estirpes brasileiras de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos da ordem Lepidoptera, Coleoptera e Diptera**. Brasília: UNB, 2003.

RODRIGUES, J. C. M.; DE SOUZA, M. L.; O'REILLY, D. R.; VELLOSO, L. M.; PINEDO, F. J. R.; RAZUCK, F. B.; RIBEIRO, B.; RIBEIRO, B. M. Characterization of the ecdysteroid UDP-glucosyltransferase (egt) gene of *A. gemmatilis nucleopolyhedrovirus*. **Vírus genes**, Dordrecht, Netherlands, v. 22, p. 103-112, 2001.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. 3. ed. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SHIN, B. S.; PARK, S. H.; CHOI, S. K.; KOO, B. T.; LEE, S. T.; KIM, J. Distribution of *cryV* – type insecticidal protein genes in *Bacillus thuringiensis* and cloning of *cryV* – type genes from *bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and *Bacillus thuringiensis* subsp. *entomocidus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 6, p. 2402-2407. 1995.

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

TAILOR, R.; TIPPETT, J.; GIBB, G.; PELLIS, S.; PIKE, D.; JORDAN, L.; ELY, S. Identification and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* delta -endotoxin entomocidal to coleopteran and lepidopteran larvae. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 6, n. 9, p. 1211-1217, 1992.

TOUNSI, S.; ZOUARI, N.; JAOUA, S. Cloning and study of the expression of a novel *cry1Ia* – type gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 95, p. 23-28, 2003.

WANG, X.; OOI, B. G.; MILLER, L. K. Baculovirus vectores for multiple gene expression and for occluded virus production. **Gene**, Amsterdam, v. 100, p. 131-137, 1991.