

Boletim de Pesquisa 190

e Desenvolvimento ISSN 1676 - 340

Dezembro, 2007

**CARACTERIZAÇÃO DE UMA NOVA
TOXINA Cry9Bb DE *Bacillus
thuringiensis***



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

ISSN 0102 0110
Dezembro, 2007

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 190

CARACTERIZAÇÃO DE UMA NOVA TOXINA Cry9Bb DE *Bacillus thuringiensis*

J.O. Silva-Werneck

D.J. Ellar

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Brasília, DF
2007

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) 448-4600 Fax: (61) 340-3624
<http://www.cenargen.embrapa.br>
e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Sergio Mauro Folle*
Secretário-Executivo: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*
Membros: *Arthur da Silva Marante*
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: *Daniele Alves Loiola*

1ª edição

1ª impressão (2007):

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

J 586 Silva-Werneck, J. O.

Caracterização de uma nova toxina Cry9Bb de *Bacillus thuringiensis* / J. O. Silva-Werneck, D.J. Ellar. -- Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007.

27 p. -- (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1676 - 1340; 190).

1. *Bacillus thuringiensis* - toxina Cry9Bb - caracterização. I. Ellar, D.J. II. Título.
III. Série.

579.362 - CDD 21.

CARACTERIZAÇÃO DE UMA NOVA TOXINA Cry9Bb DE *Bacillus thuringiensis*

J.O. Silva-Werneck¹

D.J. Ellar²

Resumo

A estirpe S725 de *Bacillus thuringiensis* subesp. *japonensis*, pertencente à Coleção de *Bacillus* entomopatogênicos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, produz cristais esféricos com atividade tóxica para a lagarta da soja, *Anticarsia gemmatalis*, e para a lagarta da folha do fumo, *Manduca sexta*. Os cristais são compostos por uma proteína de aproximadamente 130 kDa com alto nível de similaridade da sequência N-terminal e afinidade imunológica a toxinas Cry9 de Bt. Um gene tipo-*cry9* de S725 foi clonado e sequenciado. A sequência do gene possui uma ORF de 3492 pb que codifica uma proteína de 1163 aminoácidos com uma massa molecular prevista de 131,4 kDa. Análise da sequência de aminoácidos deduzida mostrou tratar-se de uma proteína única que possui 73% de identidade com Cry9Ba, 64% de identidade com Cry9Ea, 63% com Cry9Da e 59% com Cry9Ca. A nova proteína foi classificada como Cry9Bb, uma nova subclasse de δ -endotoxinas, pelo Comitê de Nomenclatura de Toxinas de Bt. O gene *cry9Bb* foi expresso em uma estirpe de Bt acristálfera, e mostrou atividade contra *M. sexta* e *A. gemmatalis*. O efeito de uma mutação pontual de um resíduo de aminoácido, A84P, foi investigado. A CL₅₀ dos cristais de Cry9Bb contra larvas neonatas de *M. sexta* foi de 4,46 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, enquanto que a CL₅₀ dos cristais do mutante foi de 0,78 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

Termos para indexação: *Bacillus thuringiensis*, toxinas Cry, genes *cry9*, *Manduca sexta*, *Anticarsia gemmatalis*, *Spodoptera frugiperda*

¹ Engenheira Agrônoma – PhD em Biologia Molecular – Pesquisadora Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – joseilde@cenargen.embrapa.br

² Biólogo – Pós-Doutor – Pesquisador e Professor - Department of Biochemistry, University of Cambridge, UK.

Abstract

The *Bacillus thuringiensis* subsp *japonensis* strain S725, which belongs do the Collection of entomopathogenic Bacillus of Embrapa Genetic Resources and Biotechnology, produces spherical crystals that have toxicity to the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*, and the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. The crystals harbour a major protein of about 130 kDa which has a high level of N-terminal identity and immunoafinity to the Cry9 class of δ -endotoxins. The *cry9*-like gene was cloned and sequenced. The gene sequence contains a 3492 bp ORF, which encodes a polypeptide of 1163 amino acids, with a predicted molecular mass of 131.4 kDa. Analysis of the deduced amino acid sequence showed that it is unique and has 73% identity with Cry9Ba, 64% identity with Cry9Ea, 63% identity with Cry9Da, and 59% identity with Cry9Ca proteins. The novel δ -endotoxin was assigned to a new subclass, Cry9Bb, by the Bt Toxin Nomenclature Committee. The Cry9Bb protein was expressed in an acrySTALLIFEROUS Bt strain, and exhibited activity against *M. sexta* and *A. gemmatalis*. The biological effect of an amino acid residue change, A84P, was investigated. The LC₅₀ for the Cry9Bb crystals against *M. sexta* neonate larvae was 4.46 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, while the LC₅₀ for the mutant 's Cry9Bb crystals was 0.78 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

Introdução

Bacillus thuringiensis (Bt) é uma bactéria cosmopolita, Gram positiva, que produz inclusões protéicas cristalinas durante o processo de esporulação. Estes cristais são compostos por uma ou mais δ -endotoxinas (proteínas Cry ou proteínas Cyt) (HÖFTE e WHITELEY, 1989; SCHNEPF et al., 1998), as quais são tóxicas para insetos de diferentes ordens como Lepidoptera, Diptera e Coleoptera (FEITELSON et al., 1992; DE MAAGD et al., 2003), e outros invertebrados como nematóides (EDWARDS et al., 1990; FEITELSON et al., 1992; KOTZE et al., 2005). As δ -endotoxinas são específicas a certos insetos e invertebrados, não afetando insetos não-alvo, plantas, vertebrados e o meio ambiente (KRIEG e LANGENBRUCH, 1981; SCHNEPF et al., 1998). Bioinseticidas à base de δ -endotoxinas com diferentes espectros de ação vêm sendo utilizados como estratégia de controle de vários insetos-praga e vetores de doenças há mais de 4 décadas (FEITELSON et al., 1992; SCHNEPF et al., 1998). O uso destas toxinas tem sido incrementado com o advento das plantas transgênicas expressando genes *cry*, conferindo resistência a insetos. Plantas Bt transgênicas de culturas economicamente importantes tais como, batata, arroz, algodão e milho, entre outras (SCHNEPF et al., 1998) estão sendo comercializadas em vários países e têm sido progressivamente plantadas nos últimos anos (ZHAO et al., 2005; ISAAA, 2007). Atualmente, mais de 380 genes *cry* e mais de 20 *cyt* já foram clonados e sequenciados. As proteínas estão classificadas em 53 classes Cry e 2 classes Cyt, de acordo com a similaridade da seqüência de aminoácidos (http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/). Programas de prospecção de genes e isolados de Bt em todo o mundo têm levado a um espectro de atividade de toxinas mais amplo, como resultado do isolamento de novas estirpes, possuindo novos genes e toxinas ou diferentes combinações de proteínas.

A estirpe de Bt denominada S725, pertencente à Coleção de *Bacillus* entomopatogênicos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia foi isolada de amostra de solo da Reserva Ecológica de Águas Emendadas, no Distrito Federal. Em testes de patogenicidade ela apresentou elevada toxicidade para a lagarta da soja, *Anticarsia gemmatalis* e para a lagarta da folha do fumo, *Manduca sexta*. Esta estirpe foi sorotipada como Bt subsp. *japonensis* e produz cristais esféricos compostos por uma nova toxina tipo-Cry9.

O objetivo deste trabalho foi caracterizar a nova δ -endotoxina da estirpe S725 quanto às suas características bioquímicas, moleculares e de toxicidade para insetos e células de insetos.

Material e métodos

Estirpes e condições de cultivo

A estirpe de *B. thuringiensis* S725 foi isolada de amostra de solo coletada na Reserva Ecológica de Águas Emendadas (DF), e está armazenada na Coleção de *Bacillus* Entomopatogênicos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Esta estirpe foi sorotipada como subespécie *japonensis* (H23). As estirpes padrões *B. thuringiensis* subesp. *kurstaki* (Btk) HD-1, Btk HD-73, Bt subesp. *tenebrionis* (Btt), Bt subsp *israelensis* (Bti) IPS78 e Bti IPS78/11 (Bti mutante sem genes de δ -endotoxina) (WARD e ELLAR, 1983b), foram obtidas da coleção do laboratório do Prof. David Ellar (Departamento de Bioquímica, Universidade de Cambridge, Inglaterra). As estirpes de Bt foram cultivadas em meio LB (Luria-Bertani) (SAMBROOK e RUSSELL, 2001), ou CCY – meio de esporulação de Bt (STEWART et al., 1981), a 30 °C, com agitação a 200 rpm, ou em placas de LB-ágar ou CCY-ágar. Antibióticos foram adicionados aos meios de cultura quando requeridos. *Escherichia coli* estirpe XL10-Gold (Stratagene) foi geralmente usada como hospedeiro para clonagem. *E. coli* estirpe XL1-Blue (Stratagene) foi usada como hospedeiro para clonagem de DNA mutante. As estirpes de *E. coli* foram crescidas a 37 °C em caldo LB ou LB-ágar suplementados com o antibiótico apropriado. Plasmídeo pGEM-3Zf(+) (Promega) foi usado para clonagem e sequenciamento e o vetor binário Bt-*E. coli* pSVP27A (CRICKMORE e ELLAR, 1992) foi usado para clonagem e expressão em Bt. Foram feitas construções derivadas de pGEM-3Zf(+) e pSVP27A, as quais estão descritas no item “Clonagem e sequenciamento”.

Preparação de DNA

DNA genômico de Bt foi extraído conforme descrito (POSPIESCH e NEUMANN, 1995), exceto que a estirpe foi cultivada em caldo LB. DNA plasmidial de Bt S725 foi extraído pelo método de lise alcalina (BIRNBOIN e DOLY, 1979), exceto que foram usados 4 mg/ml de lisozima para lisar as células por 45 minutos (min.), e o DNA foi purificado em gradiente de CsCl, como descrito (SAMBROOK e RUSSELL, 2001). DNA plasmidial de *E. coli* foi extraído usando o “QIAprep spin miniprep kit (Qiagen)”, de acordo com as instruções do fabricante. A concentração e pureza do DNA foram estimadas usando o aparelho “GeneQuant RNA/DNA calculator” (Pharmacia Biotech). As preparações de DNA foram armazenadas a – 20°C. DNA de *E. coli* para ser usado como molde em PCR de colônias para prospecção de clones foi preparado por um método de extração rápida. Neste

método, resumidamente, clones de *E. coli* foram cultivados durante a noite a 37 °C em LB-ágar contendo o antibiótico seletivo (Carbenicilina 50 µg/ml). Uma colônia foi coletada com um palito de dente, transferida para 10 µl de dH₂O (água destilada estéril) em um tubo de PCR de 500 µl (Starlab) e aquecida a 95 °C por 10 min.

PCR (reação em cadeia da polimerase)

Para sequenciamento ou clonagem, DNA plasmidial de Bt S725 foi amplificado por PCR em uma reação contendo tampão de *Taq* DNA Polimerase 1x (ou tampão de *Pfu*), MgCl₂ 1,5 mM, dNTP mix 0,2 mM, oligonucleotídeos 0,4 µM, 20 – 100 ng de DNA molde e 1,5 – 2,5 U de *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen) ou *Pfu* DNA Polimerase (Promega), em um volume final de 50 µl. As reações foram realizadas em um termociclador Techne, modelo Progene, ou Biometra T3 Gradient, com as seguintes condições gerais: desnaturação inicial a 94 ou 95 °C por 2 min., seguida de 25 ou 30 ciclos a 94 ou 95 °C por 1 min., temperatura de anelamento (vide resultados) por 30 seg. - 1 min., 72 °C por 1min., e extensão final a 72 °C por 5 min. Para produtos de PCR maiores que 3 kb, o tempo de extensão foi de 1 min. por kb de produto esperado para *Pfu*, ou 30 seg. por kb para *Taq*. Para PCR de colônias de *E. coli*, 1 µl do lisado foi adicionado a 25 µl da reação de PCR. PCR para mutação sítio-dirigida foi feita de acordo com o protocolo do “Quikchange Site-directed Mutagenesis kit” (Stratagene). Uma amostra de 15 µl de cada produto foi submetida a eletroforese em gel de agarose, o qual foi corado com brometo de etídeo.

Clonagem e sequenciamento do gene tipo-*cry9*

Um fragmento de DNA amplificado por PCR contendo um gene tipo-*cry9* da estirpe S725 foi clonado nos sítios de restrição *Bam*HI-*Sph*I do vetor pGEM-3Zf(+) (Promega) para gerar a construção pGEM725. DNA plasmidial de pGEM725 foi subclonado nos sítios *Bam*HI-*Sph*I do vetor binário Bt-*E. coli* pSVP27A (CRICKMORE e ELLAR, 1992), contendo o promotor para *cyt1Aa* para formar a construção pSVP725. O gene tipo-*cry9* em pGEM725 foi mutado (Ala84 para Pro84) e o DNA mutante foi subclonado nos sítios *Bam*HI-*Sph*I do vetor binário Bt-*E. coli* pSVP27A gerando a construção pSVP725-A84P. A transformação das estirpes de *E. coli* XL10-Gold (Stratagene) e XL1-Blue (Stratagene) com DNA contendo o gene selvagem e o gene mutante, respectivamente, foi realizada pelo método de cloreto de cálcio (SAMBROOK e RUSSELL, 2001). Os transformantes de *E. coli* XL10-Gold foram selecionados em placas de LB contendo 250 µg/ml de carbenicilina, para clonagem em

pSVP27A, ou 250 µg/ml de carbenicilina mais X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside) e IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) para clonagem em pGEM-3Zf(+). Transformantes de XL1-Blue foram selecionados em 50 µg/ml de carbenicilina. O DNA plasmidial de clones selecionados foi analisado por digestão com enzimas de restrição. O sequenciamento do DNA foi feito em um Analisador de DNA automático, modelo 3700 (Applied Biosystems). As seqüências foram analisadas com o “GCG package” (Accelrys, Wisconsin Package version 10.3), BLAST (ALTSCHUL et al., 1997) e Clustal W (THOMPSON et al., 1994). O número de acesso da seqüência de nucleotídeos no GenBank é AY758316. A fim de receber uma classificação apropriada, a seqüência de nucleotídeos foi enviada ao Comitê de Nomenclatura de Toxinas de Bt (http://www.biols.susx.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt).

Eletrotransformação de Bt

A transformação de células de Bti IPS78/11 (WARD e ELLAR, 1983a) com o plasmídeo pSVP725, contendo o gene *cry9Bb*, foi feita por eletroporação, como descrito (BONE e ELLAR, 1989). Os transformantes foram selecionados em LB-ágar contendo 6 µg/ml de cloranfenicol, a 30 °C.

Purificação dos cristais

Os cristais de Bt foram purificados em gradiente descontínuo de sacarose (THOMAS e ELLAR, 1983) nas concentrações de 2,55, 2,3 e 1,97 M sacarose. A centrifugação foi feita a 37.000 x g por 14-16 h, a 4 °C (Beckman-Coulter Optima L-100 XP, rotor SW28). A concentração protéica foi determinada pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951), usando BSA (albumina de soro bovino) como padrão. Os cristais foram distribuídos em alíquotas em tubos de 1,5 ml e congelados a – 80 °C. Algumas alíquotas de cristais contendo 1 mg de proteína foram liofilizadas (liofilizador Micromodulyo E-C). Os cristais foram armazenados a – 80 °C.

Microscopia dos cristais

Cristais purificados da estirpe Bt S725 e da recombinante SVBt725 foram observados e fotografados em microscópio de contraste de fases (Nikon Optiphot) com aumento de 1000x. Para microscopia eletrônica de varredura, suspensões de cristais de SVBt725 foram depositadas sobre suportes de alumínio e secas ao ar. Em seguida, os cristais foram

cobertos com 10 nm de Au/Pd, usando um metalizador Polaron E5100, observadas e fotografadas em microscópio eletrônico de varredura Philips XL30 FEG.

Modelo estrutural

Um modelo estrutural 3D para a proteína Cry9Bb foi gerado por Swiss-Model (www.expasy.org) e também pelo programa Modeller (Departamento de Bioquímica, Universidade de Cambridge, <http://www-cryst.bioc.cam.ac.uk/>).

Preparação de extrato intestinal de insetos

Extratos intestinais de larvas do lepidóptero *Pieris brassicae* (borboleta branca da couve) e do coleóptero *Anthonomus grandis* (bicudo do algodoeiro) foram preparados de larvas de 5º instar como descrito por Vílchez et al. (2004). O extrato intestinal de *P. brassicae* foi doado por Johanna Rees (Department of Biochemistry, University of Cambridge, UK). O sobrenadante foi esterilizado em filtro de 0,22 µm, distribuído em alíquotas de 50 µl e armazenado a – 80 °C.

Solubilização e ativação da toxina

Cristais de toxinas Cry ou Cyt foram sedimentados a 14.000 x g (centrífuga Anachem Hyspin 16K) por 15 min a 4 °C. O sedimento foi ressuspensão em tampão de solubilização [50 mM Na₂CO₃, 10 mM DTT (dithiothreitol), na faixa de pH entre 8 e 11], de 1 a 5 mg/ml, e a solução incubada a 37°C por 1 hora. O pH do tampão de solubilização e a concentração da proteína dependeram da toxina e do ensaio. O material insolúvel foi removido por centrifugação a 14.000 x g, por 10-15 min., à temperatura ambiente. A concentração da proteína solubilizada foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), usando ensaio de proteína Bio-Rad, com BSA como padrão. Toxinas solubilizadas foram ativadas por tripsina tratada com TPCK (Sigma), em taxas tripsina: toxina entre 1:1 e 1:100 (m/m), dependendo da toxina e do procedimento experimental, e incubadas a 37 °C por 1 h. A toxina da estirpe recombinante SVBt725 também foi ativada por extrato intestinal de *A. grandis* e de *P. brassicae* a 2,5%, a 37 °C por 60 min. A toxina Cyt2A foi ativada por proteinase K (Sigma) 0,1%, a 37 °C por 30 min. Após incubação, o material insolúvel foi removido e a concentração de proteína determinada pelo

método de Bradford, usando BSA como padrão. As proteínas solubilizadas e ativadas foram analisadas por SDS-PAGE e o gel corado com “coomassie blue”.

Imunodeteção de proteína Cry9

Proteínas de cristais da estirpe de Bt recombinante SVBt725 foram separadas em SDS-PAGE 12% e eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose (Pall corporation) pelo método de Towbin et al. (1979). Toxina Cry9 foi detectada com anticorpo policlonal anti-Cry9C, seguido de anticorpo secundário conjugado “goat anti-rabbit IgG peroxidase-conjugated (Sigma)”. Os anticorpos primário e secundário foram diluídos 1: 1000 em 3% (m/v) leite em pó desnatado em TTS [20 mM Tris-HCl pH 7,5; 500 mM NaCl; 0,05% (v/v) Tween 20]. A membrana foi incubada em tampão de bloqueio [3% (m/v) leite em pó desnatado em TBS (10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl)] com agitação suave, por 1 h à temperatura ambiente. Após 3 lavagens em TTS, a membrana foi incubada com o anticorpo primário por 1 h, repetiu-se as lavagens, e incubou-se com o anticorpo secundário por 1 h. Após as lavagens, a detecção foi feita usando DAB (Sigma “Fast 3,3 Diaminobenzidine”) de acordo com as instruções do fabricante.

Preparo de BBMV

BBMV (vesículas da membrana da borda escovada do intestino) de *A. grandis* foram preparadas de larvas inteiras de 4^o-5^o ínstar, e as de *P. brassicae* foram preparadas de intestino de larvas, por um método baseado em precipitação com Mg²⁺ e centrifugação diferencial (WOLFERSBERGER et al., 1987). A concentração protéica foi determinada usando o ensaio de proteínas BCA (Pierce).

Biotinilação da toxina e ensaios de ligação

A toxina Cry9Bb solubilizada e ativada foi biotiniada usando o kit “EZ-Link™ Sulfo-NHS-Biotinylation” (Pierce), de acordo com as instruções do fabricante. Uma membrana contendo proteínas de BBMV de *A. grandis* e de *P. brassicae*, toxina Cry9Bb ativada por extrato intestinal de *A. grandis* (controle negativo), e toxina Cry9Bb ativada por extrato intestinal de *A. grandis* e biotiniada (controle positivo), separadas por SDS-PAGE-12%, foi lavada com TBST [10 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,1% (v/v) Tween 20] por 20

min., com agitação suave. A membrana foi bloqueada em 3% de BSA em TBST por 30 min., à temperatura ambiente. A solução de bloqueio foi descartada e a membrana foi incubada em solução de bloqueio contendo 4,3 µg/ml de Cry9Bb biotinizada e ativada, por 30 min., com agitação suave. Após 2 lavagens em TBST por 5 min., a membrana foi incubada em estreptavidina-HRP 2 µg/ml, 0,1% BSA em TBST. A lavagem foi repetida e seguida de detecção de toxina biotinizada usando DAB Sigma Fast 3,3 Diaminobenzidine).

Bioensaios com *Manduca sexta*

Ovos de *M. sexta* (lagarta da folha do tabaco) foram fornecidos pelo “Department of Biology and Biochemistry, University of Bath, UK” e incubados em dieta artificial (BELL e JOACHIM, 1976) a 26 °C, com fotoperíodo de 16: 8 h (luz: escuro). Os bioensaios foram realizados como descrito anteriormente (VILCHEZ et al., 2004), com algumas modificações. A dieta (500 µl) foi vertida em cada poço de uma placa de cultura de células de 48 poços (Costar). Vinte µl de uma suspensão de cristais da estirpe recombinante SVBt725 (Cry9Bb) na concentração de 1 mg/ml de proteína foram aplicados na superfície da dieta sólida em cada um de 24 poços (concentração final de toxina de 20 µg/cm²). Como controle positivo, foi usada suspensão de cristais de Btk HD-73 (Cry1Ac) na concentração de 100 ng/cm² de toxina. No controle negativo, a suspensão de cristais foi substituída por dH₂O estéril. Após secagem, uma larva neonata de *M. sexta* foi colocada em cada poço, as placas foram vedadas com filme de PVC e incubadas a 26 °C, fotoperíodo de 16: 8 h (luz: escuro), por 5 dias. A mortalidade foi verificada e a CL₅₀ calculada por análise de Próbites (FINNEY, 1971). O bioensaio foi repetido pelo menos 3 vezes e a CL₅₀ média obtida. Também foram realizados bioensaios com cristais da proteína mutante Cry9BbA84P contra *M. sexta* usando a mesma metodologia.

Bioensaios com *Mamestra brassicae* e *Pieris brassicae*

Ovos de *M. brassicae* (lagarta do repolho) e de *P. brassicae* (borboleta branca da couve) foram fornecidos pelo “Centre for Ecology and Hydrology (CEH), Oxford, UK” e “Warwick Horticulture Research International, Warwick University, UK”, respectivamente. As larvas foram mantidas em dieta artificial (LIGHTWOOD, 1999), nas condições descritas para *M. sexta*. Nos bioensaios dos cristais de Cry9Bb com *M. brassicae* e *P. brassicae* foram usados os mesmos procedimentos e concentrações descritos para bioensaios com *M. sexta*, exceto que para *M. brassicae*, uma suspensão de cristais compostos por Cry1Ca a 200 ng/cm² de toxina foi usada como controle positivo.

Bioensaios com *Anticarsia gemmatalis* e *Spodoptera frugiperda*

A. gemmatalis (lagarta da soja) e *S. frugiperda* (lagarta do cartucho-do-milho) foram mantidos a $28 \pm 2^\circ\text{C}$, $70 \pm 10\%$ UR, e fotoperíodo de 14: 10 horas (luz: escuro), em dieta artificial (MONNERAT et al., 2007). Os bioensaios foram realizados conforme descrito (MONNERAT et al., 2007), usando suspensão de cristais de Cry9Bb com as concentrações de proteína de $21,4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ e $2,14 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ para *A. gemmatalis* e $17,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ e $1,75 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ para *S. frugiperda*.

Bioensaios com *Musca domestica*

Pupas de *M. domestica* foram fornecidas pela Seção de Entomologia, Departamento de Proteção de Plantas, Universidade de Sassari, Itália. Os bioensaios foram realizados com dez moscas adultas, com 3 repetições, como descrito previamente (RUIU et al., 2006), usando suspensões de cristais de Cry9Bb a $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ de proteína em solução de sacarose 30%. A mortalidade foi observada diariamente por 5 dias.

Bioensaios com *A. grandis*

Bioensaios com *A. grandis* foram gentilmente realizados pelo grupo do Dr. V. Sanchis (Instituto Pasteur, Paris, França). Uma suspensão de cristais de Cry9Bb foi incorporada em dieta artificial (ESPINASSE et al., 2003) nas concentrações de $60 \mu\text{g}/\text{ml}$ e $120 \mu\text{g}/\text{ml}$ de toxina em placas de cultura de células de 24 poços. A mortalidade de larvas neonatas foi verificada após 3 semanas e a porcentagem de mortalidade calculada para duas repetições.

Bioensaios com *Trichoplusia ni*

Bioensaios com o lepidóptero *T. ni* foram gentilmente realizados pelo grupo do Dr. Jorge Ibarra (CINVESTAV-IPN, Irapuato, México). Pequenos pedaços de papel com aproximadamente 100 ovos de *T. ni* colados por pedaço, foram submersos em 2 ml de uma suspensão de cristais de Cry9Bb a $1 \text{ mg}/\text{ml}$ de toxina, contendo Tween 80 a 0,05%. Após secagem, os papéis foram colocados em uma placa de Petri com uma pequena quantidade de dieta. Ao emergirem, as larvas consumiam toxina junto com o córion. Como controle positivo, usou-se uma suspensão de cristais de Btk HD-1, e como controle

negativo, usou-se uma solução de Tween 80 a 0,05%. A mortalidade foi verificada 5 dias após o tratamento e expressa em porcentagem.

Bioensaios com Aedes aegypti

Bioensaios com o mosquito *A. aegypti* foram gentilmente realizados pelo grupo do Dr. Jorge Ibarra (CINVESTAV-IPN, Irapuato, México). Vinte larvas de 4^o ínstar foram colocadas em 100 ml de água declorinada, e 200 µl de uma suspensão de cristais a 1 mg/ml contendo Tween 80 a 0,05% foram adicionados. Uma suspensão de cristais de Bti foi usada como controle positivo, e Tween 80 a 0,05% como controle negativo. A mortalidade foi verificada 24 horas após o tratamento.

Bioensaios com Diabrotica virgifera, D. undecimpunctata e Leptinotarsa decemlineata

Bioensaios com os coleópteros *D. virgifera*, *D. undecimpunctata* e *Leptinotarsa decemlineata* foram gentilmente realizados pelo grupo do Dr. A. Abad (Pioneer Hi-Bred, Johnston, Iowa, USA). A toxina Cry9Bb foi solubilizada em Na₂CO₃ 25 mM, pH 10, diluída na proporção de 1:3, e 10 concentrações (de 75,75 µg/cm² a 3,84 ng/cm²) foram testadas. Foram feitas três repetições por tratamento (concentração). Amostras da toxina foram aplicadas sobre a dieta do inseto em placas de cultura de células de 96 poços (25 µl por poço), com 8 poços por concentração. Após secagem, larvas neonatas (1 a 3, dependendo da espécie testada) foram adicionadas por poço. As placas seladas foram incubadas a 28 °C e 40-50% UR. A mortalidade foi avaliada após 4 dias. Como controles positivos foram usadas duas toxinas de propriedade da empresa preparadas como a toxina testada. Como controles negativos foram usadas dieta de criação e dieta adicionada do tampão de solubilização.

Bioensaios com Helicoverpa zea, Ostrinia nubilalis, Plutella xylostella e Agrotis ipsilon

Bioensaios com os lepidópteros H. zea, O. nubilalis, P. xylostella e A. ipsilon foram gentilmente realizados pelo grupo do Dr. A. Abad (Pioneer Hi-Bred, Johnston, Iowa, USA). Foram testadas três diferentes preparações da toxina Cry9Bb: a) toxina solubilizada em Na₂CO₃ 25 mM, pH 10; b) toxina solubilizada em Na₂CO₃ 25 mM, pH 10, DTT 10 mM; c) toxina solubilizada em Na₂CO₃ 25 mM, pH 10, DTT 10 mM, e ativada por tripsina a 1:50 (m/m) enzima: toxina. As preparações foram diluídas na proporção de 1:3 e 10 concentrações (de 63,8 µg/cm² a 1,9 ng/cm²) foram testadas, com três repetições por

tratamento. Usou-se o procedimento descrito acima para larvas de coleópteros. Como controles positivos foram usadas 3 toxinas de propriedade da empresa preparadas como a toxina testada. Como controles negativos foram usadas dieta de criação e dieta adicionada do tampão de solubilização.

Ensaio de citotoxicidade

Foram realizados ensaios de citotoxicidade da toxina Cry9Bb para células de lepidópteros *A. gemmatalis* linhagem UFL-Ag-286, *M. sexta* linhagem GV1 e *Choristoneura fumiferama* linhagem CF1. Os ensaios foram realizados em placas de cultura de células de 24 poços, onde o meio das células foi substituído por meio contendo a toxina ativada por tripsina em concentrações de até 200 µg/ml. As células foram incubadas à temperatura ambiente sob um microscópio invertido (Nikon Diaphot-TMD) e fotografadas nos tempos 0 e 180 minutos para tratamentos com toxinas Cry, e em 0 e 30 minutos para tratamentos com a toxina Cyt2A. A toxina Cry1Ac ativada por tripsina foi usada como controle positivo para CF1 na concentração de 200 µg/ml, e a toxina Cyt2A ativada por proteinase K, como controle positivo para as outras células (de 1 a 5 µg/ml). Como controle negativo, adicionou-se o mesmo volume do tampão de solubilização, contendo a mesma concentração de tripsina ou proteinase K usados no ensaio.

Mutagênese sítio-dirigida

Mutação sítio-dirigida no DNA do gene *cry9Bb*, a fim de substituir Ala84 por Pro84 na sequência da proteína, foi realizada conforme protocolo do "Quikchange Site-directed Mutagenesis kit" (Stratagene). Os efeitos na atividade da toxina foram avaliados através de solubilização, ativação e bioensaios de Cry9BbA84P contra larvas de *M. sexta*.

Resultados

Clonagem e sequenciamento do gene tipo-*cry9*

O gene completo tipo-*cry9* foi amplificado por PCR com os oligonucleotídeos End9 (d) (CACAGGAGGATCCTAAGATTG) e End9 (r) (GAATTCTTTCTTTATAAGG), desenhados

com base na sequência de *cry9Ea* e posicionada -123 pb “upstream” e +3656 pb “downstream” do códon de iniciação, respectivamente. O produto de PCR foi purificado e sequenciado. Uma sequência de 3791 pb contendo o gene tipo-*cry9* de S725 (*cry9-725*) foi obtida e analisada. Uma ORF de 3492 pb foi identificada e um mapa de restrição obtido. A fim de clonar o gene *cry9-725*, foram desenhados os oligonucleotídeos Up725 (5' ATGGATCCAAGAGTGTGTCAGG 3') e Sph725 (5' CCCCCGCATGCTCCTTCTACC 3') para introduzir um sítio de *Bam*HI, 77 pb “upstream” do códon de iniciação, e um sítio de *Sph*I, 98 pb “downstream” do códon de terminação do gene, respectivamente. Foi feita PCR com estes oligonucleotídeos usando o DNA plasmidial da estirpe S725 purificado em gradiente de CsCl e *Pfu* DNA polimerase (Promega). O produto de PCR de 3678 pb foi purificado, digerido com *Bam*HI e *Sph*I e clonado em pGEM-3Z f(+), gerando o plasmídeo pGEM725. O gene *cry9-725* foi então subclonado no vetor binário pSVP27A, gerando o plasmídeo pSVP725, e sequenciado. A sequência de 3951 pb obtida contém uma ORF de 3492 pb, a qual codifica um polipeptídeo de 1163 aminoácidos, com uma massa molecular prevista de 131,4 kDa. O novo gene e a nova proteína foram classificados como *cry9Bb* e Cry9Bb, respectivamente, pelo Comitê de Nomenclatura de Toxinas de Bt (http://www.biols.susx.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt). A sequência de nucleotídeos do gene *cry9Bb* foi depositada no GenBank com o número de acesso AY758316.

Expressão do gene *cry9Bb*

Cristais do clone de Bt recombinante SVBt725, expressando o gene *cry9Bb*, foram purificados em gradiente descontínuo de sacarose. A estirpe recombinante produziu cristais esféricos, similares àqueles produzidos pela estirpe S725, como observado por microscopia de contraste de fases com aumento de 1000x e por microscopia eletrônica de varredura (Fig.1]

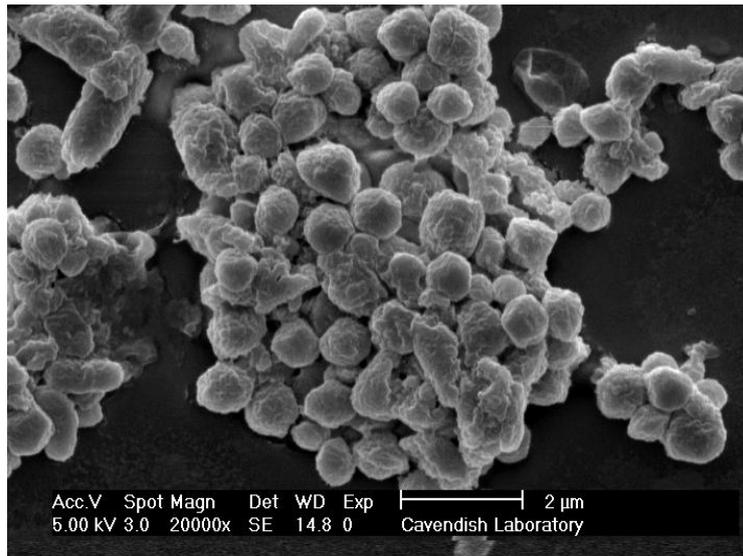


Figura 1. Microscopia eletrônica de varredura de cristais da estirpe recombinante de *B. thuringiensis* SVBt725.

Análise da sequência da proteína

Busca de homologia da sequência da proteína Cry9 por BLASTx mostrou que os mais altos níveis de identidade foram: 73% com CryX (SHEVELEV et al., 1993), atualmente classificada com Cry9Ba; 64% com Cry9Ea (MIDOH e OYAMA, 2006), 63% com Cry9Da (ASANO, 1996) e 59% de identidade com Cry9Ca (LAMBERT et al., 1996). A sequência da proteína e as sequências dos prováveis domínios estruturais foram alinhados com holotipos de proteínas Cry9 pelo método Clustal W. Os 5 blocos conservados de sequências identificados por Höfte e Whiteley em várias toxinas Cry (HÖFTE e WHITELEY, 1989) foram localizados (dados não mostrados). Análises de similaridade para cada domínio mostraram que a proteína Cry9Bb de S725 (Cry9-725) é mais relacionada a Cry9Ba nos domínios I e II (72,4% e 61% de similaridade, respectivamente), enquanto mais próxima de Cry9Da no domínio III (47,3%). Uma árvore filogenética foi obtida através do programa Mega 2.1, usando o método de evolução mínima (Fig.2). Pode ser observado que Cry9-725 é mais proximamente relacionada à proteína Cry9Ba.

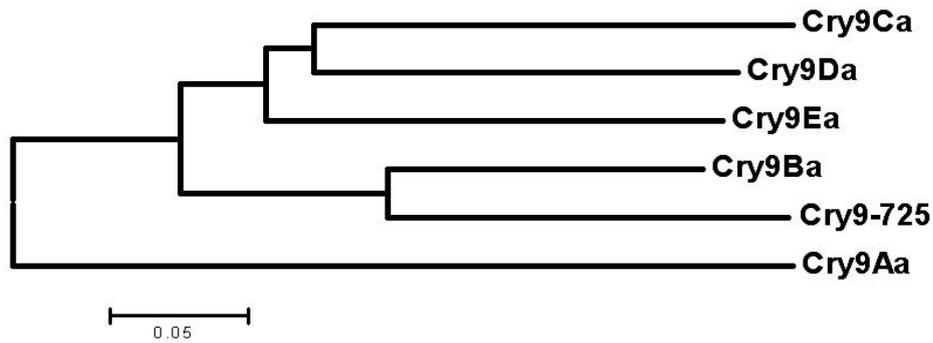


Figura 2. Árvore filogenética de proteínas Cry9. Distâncias filogenéticas calculadas pelo programa Mega 2.1, usando o método de evolução mínima. A proteína Cry9Bb de *B. thuringiensis* estirpe S725 está representada como Cry9-725.

Modelo estrutural

Buscas por similaridades da estrutura protéica prevista foram feitas usando os programas FUGUE e Swiss-Model. Ambos identificaram similaridades entre a nova proteína e estruturas tri-dimensionais (3D) de proteínas Cry presentes nas bases de dados de PDB. Alinhamentos da seqüência de Cry9 de S725 (Cry9Bb) com seqüências das proteínas Cry, feitos por Swiss-Model, mostraram as seguintes identidades: 30,78% com Cry1Aa (acesso 1CIY); 24,5% com Cry2Aa (acesso 1I5P); 31,4% com Cry3A (acesso 1DLC) e 28,8% com Cry3Bb (acesso 1JI6). Apesar das baixas similaridades de seqüências, o programa Swiss-Model gerou um modelo 3D para a nova proteína, contendo três domínios estruturais, semelhante às δ -endotoxinas conhecidas. Um modelo estrutural 3D para a proteína Cry9Bb também foi gerado pelo programa Modeller (Rinaldo Montalvão, Departamento de Bioquímica, Universidade de Cambridge). Este modelo também foi baseado nas estruturas 3D de proteínas Cry disponíveis nas bases de dados de PDB e é muito semelhante ao modelo construído automaticamente pelo programa Swiss-Model. O modelo também prevê uma estrutura de três domínios (Fig. 3).

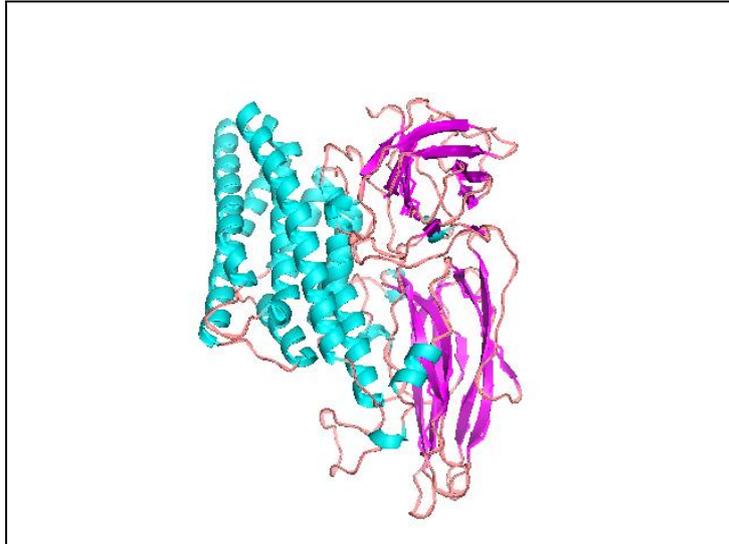


Figura 3. Modelo da estrutura tri-dimensional da proteína Cry9Bb de *B. thuringiensis* estirpe S725 gerada pelo programa Modeller.

Solubilização e ativação da nova toxina Cry9

Análise em 12% SDS-PAGE dos cristais do recombinante SVBt725 mostrou que a proteína Cry9Bb expressa tem massa molecular de aproximadamente 130 kDa (Fig. 4).

Solubilização dos cristais em Na₂CO₃ 50 mM, DTT 10 mM, em diversos valores de pHs (pH 8,0; 8,5; 9,0; 9,5; 10; 10,5 e 11) resultou em uma banda principal de 130 kDa em toda a faixa de pH, sendo mais forte entre pH 8 e 9, e em pH 11. Foi feita ativação por tripsina em diferentes taxas tripsina: toxina [1:1, 1:2, 1:5, 1:10, 1:20, 1:30, 1:40 e 1:50 (m/m)] ou por extrato intestinal de insetos [2,5% (v/v) de extrato de *A. grandis* ou *P. brassicae*]. Ativação de Cry9Bb por tripsina produziu dois fragmentos principais por volta de 69 e 58 kDa (Fig. 4). Ativação por extrato intestinal de *A. grandis* ou *P. brassicae* produziu um fragmento de aproximadamente 70 kDa (Fig. 4) ou 66 kDa, respectivamente.

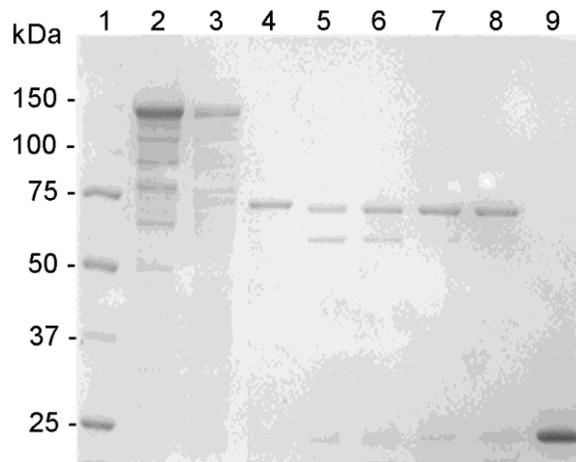


Figura 4. SDS-PAGE dos cristais e produtos de solubilização e ativação da proteína expressa pela estirpe recombinante SVBt725. Cristais de Cry9Bb purificados foram solubilizados em pH 9 e ativados por extrato intestinal de *A. grandis* ou tripsina em diversas taxas tripsina: toxina. Dez μg de cristais ou 8 μg de toxina solubilizada ou ativada foram aplicados por poço, os fragmentos separados em SDS-PAGE 12% e corados com "coomassie blue". 1 - marcador de massa molecular (kDa); 2 - cristais de SVBt725; 3 - toxina Cry9Bb solubilizada; 4 - toxina ativada por 2,5% (v/v) de extrato intestinal de *A. grandis*; 5 - toxina ativada por tripsina a 1:1 (m/m) tripsina: toxina; 6 - toxina ativada a 1:2 (m/m) tripsina: toxina; 7 - toxina ativada a 1:5 (m/m) tripsina: toxina; 8 - toxina ativada a 1:10 (m/m) tripsina: toxina; 9 - tripsina (10 μg).

Imunodeteção de proteína Cry9

Foram feitas reações para imunodeteção de Cry9 em cristais do recombinante SVBt725, toxina solubilizada e toxina ativada. Cristais de S725 foram usadas como controle positivo da reação. Sinais positivos fortes foram observados para os cristais de ambas as estirpes e para a toxina solubilizada (Fig. 5). Somente uma banda abaixo de 25 kDa (não visível no gel corado com "coomassie blue") foi detectada entre os produtos de ativação da proteína (Fig. 5).

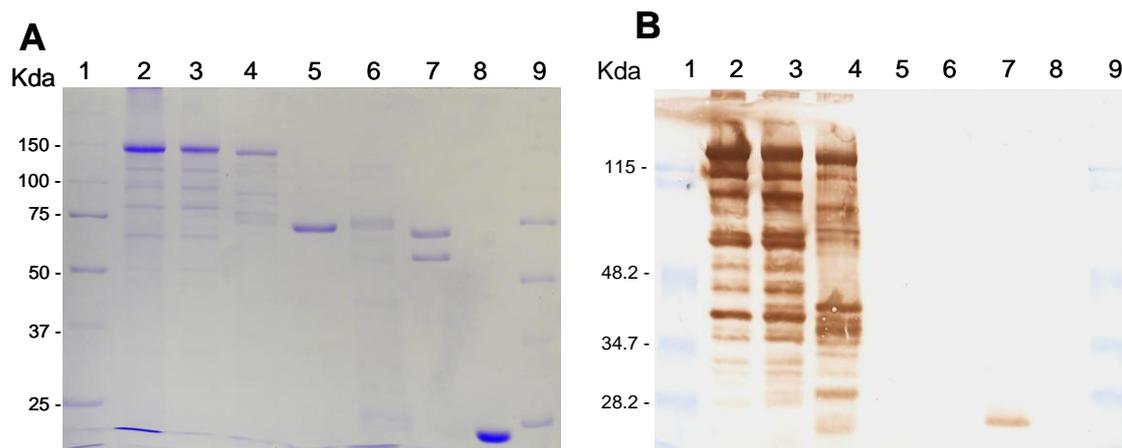


Figura 5. Imunodeteccção de Cry9 nas proteínas das estirpes de *B. thuringiensis* S725 e SVBt725. Cristais de SVBt725 foram solubilizados em pH 8,5 e a proteína ativada com extrato intestinal de *A. grandis* ou tripsina. A) Os fragmentos das proteínas foram separados em SDS-PAGE-12% e corados com "coomassie blue". Dez μg de cristais ou 8 μg de toxina solubilizada ou ativada foram aplicados por poço. 1 e 9 - marcador de massa molecular (kDa); 2 – cristais de S725; 3 – cristais de SVBt725; 4 – toxina de SVBt725 solubilizada; 5 - toxina de SVBt725 ativada por 2,5% (v/v) de extrato intestinal de *A. grandis*; 6 – proteínas do extrato intestinal de *A. grandis*; 7 – toxina ativada por tripsina a 1:10 (m/m) tripsina: toxina; 8 - tripsina (8 μg). B) Membrana com as proteínas transferidas de um gel idêntico ao gel em A, incubada com anticorpo policlonal para proteína Cry9C. Legenda como em A.

Ensaio de ligação

Nos ensaios de ligação de toxina Cry9Bb biotinilada a BBMV de *A. grandis* e *P. brassicae* não foi observada afinidade da toxina a possíveis receptores na BBMV destes insetos (dados não mostrados).

Bioensaios

Foram realizados bioensaios com os lepidópteros *M. sexta*, *M. brassicae*, *P. brassicae*, *A. gemmatalis*, *S. frugiperda* e *T. ni*, o coleóptero *A. grandis*, e os dípteros *A. aegypti* e *M. domestica*, usando cristais da estirpe recombinante SVBt725 (proteína Cry9Bb). Nas concentrações testadas, a toxina causou mortalidade elevada de *M. sexta* e *A. gemmatalis* (Tabela 1). Para *A. grandis*, testou-se a concentração de 120 $\mu\text{g/ml}$ de toxina, para *A. aegypti* testou-se 2 $\mu\text{g/ml}$ de toxina e para *M. domestica*, 50 $\mu\text{g/ml}$, e não foi observada mortalidade. Para os lepidópteros, as concentrações mais elevadas testadas, os controles positivos e a mortalidade são mostrados na Tabela 1. Bioensaios com os coleópteros *D. virgifera*, *D. undecimpunctata* e *L. decemlineata* foram realizados com a toxina solubilizada em 10 concentrações, sendo a mais alta de 75,75 $\mu\text{g/cm}^2$. Nenhuma mortalidade foi

observada para estas espécies de coleóptero. Os bioensaios com os lepidópteros *H. zea*, *O. nubilalis*, *P. xylostella* e *A. ipsilon* foram realizados com a toxina solubilizada em duas diferentes preparações e com a toxina ativada. Para estes lepidópteros não houve mortalidade causada pela toxina em nenhum dos tratamentos. Os dados para a toxina e os controles positivos solubilizados em tampão Na₂CO₃ 25 mM, pH 10, DTT 10 mM, na mais alta concentração de toxina testada encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1. Atividade inseticida (% de mortalidade) da toxina Cry9Bb de *B. thuringiensis* contra larvas de lepidópteros.

Inseto-alvo	Cry9Bb		Controle positivo	
	Concentração	% mortalidade	Identidade e concentração	% mortalidade
<i>Manduca sexta</i>	20 µg/cm ²	83	Cry1Ac 100 ng/cm ²	100
<i>Mamestra brassicae</i>	20 µg/cm ²	0	Cry1Ca 200 ng/cm ²	45,8
<i>Pieris brassicae</i>	20 µg/cm ²	0	Cry1Ac 100 ng/cm ²	75
<i>Anticarsia gemmatalis</i>	21,4 µg/cm ²	91,6	Btk HD1 21,4 µg/cm ²	100
<i>Spodoptera frugiperda</i>	17,5 µg/cm ²	16,6	Btk HD1 17,5 µg/cm ²	100
<i>Trichoplusia ni</i>	1 mg/ml	2	Btk HD1 1 mg/ml	44,4
<i>Helicoverpa zea</i>	63,8 µg/cm ²	0	63,8 µg/cm ²	72,7
<i>Ostrinia nubilalis</i>	63,8 µg/cm ²	0	63,8 µg/cm ²	100
<i>Plutella xylostella</i>	63,8 µg/cm ²	0	63,8 µg/cm ²	100
<i>Agrotis ipsilon</i>	63,8 µg/cm ²	0	63,8 µg/cm ²	60

Foram realizados bioensaios para cálculo de CL₅₀ da toxina Cry9Bb contra *M. sexta*. A Tabela 2 mostra as CL₅₀ médias, calculadas a partir de três bioensaios, dos cristais de Cry9Bb e de Cry1Ac contra larvas neonatas de *M. sexta*.

Tabela 2. Valores de CL₅₀ para cristais de Cry9Bb e Cry1Ac contra larvas neonatas de *M. sexta*

Toxina	CL ₅₀ *	Limite de confiança de 95%
Cry9Bb	9,21 µg/cm ²	5,47 – 19,03 µg/cm ²
Cry1Ac	3,93 ng/cm ²	2,56 – 6,06 ng/cm ²

CL₅₀* = concentração letal para 50% da população testada.

A toxina Cry9Bb foi aproximadamente 2340 vezes menos tóxica do que a da proteína padrão Cry1Ac para este inseto.

Ensaio de citotoxicidade

Ensaio de citotoxicidade da toxina Cry9Bb ativada contra células de *A. gemmatilis* UFL-Ag-286, *M. sexta* GV1 e *C. fumiferana* CF1 não mostraram efeitos visíveis em concentrações de até 200 µg/ml para UFL-Ag-286 e CF1 e de até 100 µg/ml para GV1, após 3 horas de tratamento. A toxina Cry1Ac a 200 µg/ml causou arredondamento das células (efeito citológico) de UFL-Ag-286 e CF1. A toxina Cyt2A causou rápido arredondamento de células de UFL-Ag-286 na concentração de 1 µg/ml e rápida e completa lise de CF1 na concentração de 4 µg/ml (dados não mostrados).

Análise da mutação sítio-dirigida

Usando um alinhamento de estruturas previstas de proteínas Cry, observou-se que Pro84 é um resíduo conservado nas toxinas Cry9, exceto Cry9Bb, como também em Cry1, Cry3, Cry7 e Cry8. Este resíduo foi substituído por Ala no domínio I de Cry9Bb, na região entre a hélice α1 e a hélice α2A. Foi, então, feita mutagênese sítio-dirigida para substituir Ala84 por Pro84 na protoxina Cry9Bb, a fim de testar seu efeito na atividade biológica. O gene mutado no plasmídeo pSVP725-A84P foi expresso em Bti IPS78/11. O clone selecionado produziu cristais esféricos, semelhantes ao da estirpe parental SVBt725. Os cristais da estirpe mutante e da parental foram solubilizados em tampão de solubilização em três diferentes pHs (8,5; 9,0 e 9,5) e as proteínas ativadas por tripsina a 1:100 (m/m) tripsina: toxina. Solubilização da proteína mutante Cry9BbA84P produziu uma banda de aproximadamente 130 kDa, como Cry9Bb. A ativação resultou em 2 bandas principais por volta de 69 e 58 kDa para ambas as proteínas (dados não mostrados). As concentrações obtidas para proteínas solubilizadas e ativadas nos diferentes pHs sugerem que a toxina mutante é ligeiramente mais solúvel do que a parental nas condições testadas (dados não mostrados). O efeito da mutação na atividade biológica foi analisado através de bioensaios com larvas de *M. sexta* dos cristais da proteína Cry9BbA84P e de Cry9Bb em paralelo.

As CL₅₀ médias, calculadas a partir de três bioensaios, estão mostradas na Tabela 3.

Tabela 3 Valores de CL₅₀ para cristais de Cry9Bb e Cry9BbA84P contra larvas neonatas de *M. sexta*

Toxina	CL ₅₀ * μg/cm ²	Limite de confiança de 95% - μg/cm ²
Cry9Bb	4,46	2,05 – 15,56
Cry9BbA84P	0,78	0,41 – 1,53

CL₅₀* = concentração letal para 50% da população testada

A toxina Cry9BbA84P, com a mutação A84P, é 5,7 vezes mais tóxica do que Cry9Bb contra larvas neonatas de *M. sexta*.

Discussão

Um gene tipo-*cry9* da estirpe S725 de Bt subesp. *japonensis* foi clonado e sequenciado e expresso. A busca por homologia (BLASTx) da sequência de aminoácidos deduzida revelou um nível elevado de identidade com δ-endotoxinas Cry9, sendo a mais alta identidade com Cry9Ba (73%). Baseado na identidade da sequência de aminoácidos, a proteína foi classificada como uma nova δ-endotoxina, Cry9Bb. O novo gene *cry9Bb* difere nitidamente do gene críptico *cryX*, atualmente classificado como *cry9Ba*, isolado de uma estirpe de Bt subesp. *galleriae*, o qual não é expresso naturalmente *in vivo* (SHEVELEV et al., 1993). Análise da árvore filogenética das sequências de protoxinas da família Cry9, incluindo a nova proteína Cry9 de S725, mostrou que esta está mais próxima de Cry9B, enquanto Cry9A está afastada das outras proteínas Cry9. Perfil semelhante foi encontrado por Bravo (BRAVO, 1997) ao analisar relações filogenéticas de proteínas Cry. Bravo mostrou que a toxina Cry9Aa estava localizada distante das toxinas Cry9Ba e Cry9Ca, sugerindo que Cry9Aa evoluiu independentemente das outras toxinas Cry9.

Os cristais formados pela proteína Cry9Bb expressa pela estirpe de Bt recombinante SVBt725 foram solubilizados, resultando em uma proteína de 130 kDa que, após ativação por tripsina, produz dois fragmentos principais de 69 e 58 kDa. Imunodeteção com anticorpo policlonal anti-Cry9C mostrou reações positivas fortes para os cristais e para a toxina solubilizada, porém não foi detectada nos fragmentos da toxina ativada, sugerindo que o epitopo de Cry9 não está localizado nos principais fragmentos da toxina ativada. Bioensaios com a nova proteína Cry9Bb foram realizados com 10 espécies da ordem Lepidoptera, 4 de Coleoptera e 2 de Diptera. A toxina mostrou atividade contra os lepidópteros *M. sexta* (lagarta do tabaco) e *A. gemmatilis* (lagarta da soja). Para as outras espécies, a toxina mostrou baixa ou nenhuma atividade nas condições e doses testadas. Não foi observada afinidade da toxina a receptores na BBMV de *A. grandis* e *P. brassicae*,

o que está de acordo com a falta de toxicidade, já que a ligação da toxina Cry a receptores no epitélio do intestino médio do inseto é um importante fator determinante da especificidade da toxina (PIGOTT e ELLAR, 2007).

A CL₅₀ de Cry9Bb contra larvas neonatas de *M. sexta* (9,21 µg/cm²) foi muito mais alta do que a LC₅₀ da toxina de referência Cry1Ac (3,93 ng/cm²). O alto nível de susceptibilidade de *M. sexta* para Cry1Ac já foi relatado por vários grupos de pesquisa (LEE et al., 2001; GILLILAND et al., 2002; VILCHEZ et al., 2004). Gilliland e colaboradores (GILLILAND et al., 2002), por exemplo, obtiveram uma CL₅₀ de 0,033 µg/ml para cristais de Cry1Ac contra larvas neonatas de *M. sexta* e de 1,24 µg/ml para larvas de terceiro ínstar. Por outro lado, uma atividade muito mais baixa foi relatada para a toxina Cry1Ba1 contra larvas de *M. sexta*. Zhong e colaboradores (ZHONG et al., 2000) obtiveram uma CL₅₀ de 0,19 mg/ml para cristais de Cry1Ba1 contra larvas neonatas desta espécie.

Nos ensaios de citotoxicidade com células de *A. gemmatalis* UFL-Ag-286, *M. sexta* GV1 e *C. fumiferana* CF1 a toxina Cry9Bb ativada não mostrou efeitos citopáticos visíveis nas concentrações testadas. Isto pode ser devido à ausência de receptores nas células derivadas de diferentes tecidos, que não do intestino médio (KNOWLES et al., 1986; ZHONG et al., 2000). Há relatos de que culturas de células de insetos não possuem os receptores normais do intestino médio e que não respondem tão especificamente às toxinas como os insetos (SCHNEPF et al., 1998).

Para determinar se a substituição de um aminoácido teoricamente conservado no domínio I da toxina resultou em efeitos biológicos, Ala84 em Cry9Bb foi substituída por Pro84. As propriedades da proteína mutante foram avaliadas através de análises de solubilidade, ativação por tripsina e toxicidade para *M. sexta*. Cry9Bb e Cry9BbA84P mostraram um perfil de solubilização e ativação similares, indicando que a toxina mutante é estável e a estrutura da proteína não foi alterada significativamente (ALCANTARA et al., 2001).

Entretanto, um ligeiro aumento na solubilidade dos cristais e um aumento de quase 6 vezes na toxicidade da mutante para *M. sexta* foi observada. O domínio I nas toxinas Cry está envolvido na inserção na membrana, oligomerização da toxina e formação dos poros (BRAVO, 1997; GERBER e SHAI, 2000; DE MAAGD et al., 2001). Mutações em diferentes resíduos neste domínio têm mostrado efeitos variáveis na toxicidade, com aumento ou redução desta (SCHNEPF et al., 1998). Neste trabalho, como uma razão para a atividade aumentada do mutante Cry9BbA84P, sugere-se que a troca do aminoácido flexível Alanina na cadeia lateral por um mais hidrofóbico e menos flexível, Prolina, no domínio I, pode ter contribuído para uma maior estabilidade termodinâmica da proteína, incrementando o processo de formação de poros e, conseqüentemente, sua toxicidade.

Conclusões

A estirpe S725 de *Bt* subsp. *japonensis* produz cristais compostos por uma nova e única δ -endotoxina Cry9Bb, a qual possui atividade contra alguns insetos lepidópteros. Para melhor investigar o espectro de ação da nova toxina, ela deve ser testada contra outras espécies de lepidópteros, contra insetos de outras ordens, como Orthoptera e Hemiptera, e mesmo contra outros invertebrados, como nematóides. A atividade da toxina pode ser incrementada através de manipulação da sequência de aminoácidos, por meio de mutações sítio-dirigidas.

Agradecimentos

Esta pesquisa recebeu o apoio financeiro do CNPq. Somos muito gratos aos pesquisadores que gentilmente colaboraram na realização de bioensaios (Dr. V. Sanchis, Dr. J. Ibarra, Dr. A. Abad, Dr. L. Ruiu e Dra. R. Monnerat), e ao Dr. Bergmann Ribeiro pelas sugestões ao manuscrito.

Referências

- ALCANTARA, E. P.; ALZATE, O.; LEE, M. K.; CURTISS, A.; DEAN, D. H. Role of alpha-helix seven of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab delta-endotoxin in membrane insertion, structural stability, and ion channel activity. **Biochemistry (Washington)**, Easton, US, v. 40, n. 8, p.2540-2547, 2001.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, London, v. 25, p. 3389-3402, 1997.
- ASANO, S. Identification of *cry* gene from *Bacillus thuringiensis* by PCR and isolation of unique insecticidal bacteria. **Memories of the Faculty of Agriculture of Hokkaido University**, v. 19, p. 529-563, 1996.
- BELL, R. A.; JOACHIM, F. G. Techniques for rearing laboratory colonies of tobacco hornworms and pink bollworms. **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, US, v. 69, p. 365-373, 1976.
- BIRNBOIN, H. C.; DOLY, J. A. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Research**, London, v. 7, p. 1513-1523, 1979.
- BONE, E. J.; ELLAR, D. J. Transformation of *Bacillus thuringiensis* by electroporation. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 58, p. 171-178, 1989.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

- BRAVO, A. Phylogenetic relationships of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin family proteins and their functional domains. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 179, n. 9, p. 2793-2801, 1997.
- CRICKMORE, N.; ELLAR, D. J. Involvement of a possible chaperonin in the efficient expression of a cloned CryIIA δ -endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*. **Molecular Microbiology**, Salem, US, v. 6, p. 1533-1537, 1992.
- DE MAAGD, R. A.; BRAVO, A.; BERRY, C.; CRICKMORE, N.; SCHNEPF, H. E. Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, US, v. 37, p. 409-433, 2003.
- DE MAAGD, R. A.; BRAVO, A.; CRICKMORE, N. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. **Trends in Genetics: DNA Differentiation & Development**, Amsterdam, v. 17, n. 4, p.193-199, 2001.
- EDWARDS, D. L.; PAYNE, J.; SOARES, G. G. **Novel isolates of *Bacillus thuringiensis* having activity against nematodes**. US Patent 4,948,734. 1990.
- ESPINASSE, S.; CHAUFaux, J.; BUISSON, C.; PERCHAT, S.; GOHAR, M.; BOURGUET, D.; SANCHIS, V. Occurrence and linkage between secreted insecticidal toxins in natural isolates of *Bacillus thuringiensis*. **Current Microbiology**, New York, v. 47, p. 501-507, 2003.
- FEITELSON, J. S.; PAYNE, J.; KIM, L. *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. **Bio/Technology**, New York, v. 10, p. 271-275, 1992.
- FINNEY, D. J. **Probit analysis**. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1971
- GERBER, D.; SHAI, Y. Insertion and organization within membranes of the delta-endotoxin pore-forming domain, helix 4-loop-helix 5, and inhibition of its activity by a mutant helix 4 peptide. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, US, v. 275, n. 31, p. 23602-23607, 2000.
- GILLILAND, A.; CHAMBERS, C. E.; BONE, E. J.; ELLAR, D. J. Role of *Bacillus thuringiensis* Cry1 δ -endotoxin binding in determining potency during lepidopteran larval development. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 68, n. 4, p. 1509-1515, 2002.
- HÖFTE, H.; WHITELEY, H. R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 53, n. 2, p. 242-255, 1989.
- ISAAA. ISAAA Brief 35-2006: Executive Summary. Disponível em: <[HTTP://WWW.ISAAA.ORG/RESOURCES/PUBLICATIONS/BRIEFS/35/EXECUTIVESUMMARY/DEFAULT.HTML](http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/35/executivesummary/default.html)>. Acesso em: 16 ago. 2007.
- KNOWLES, B. H.; FRANCIS, P. H.; ELLAR, D. J. Structurally related *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins display major differences in insecticidal activity *in vivo* and *in vitro*. **Journal of Cell Science**, London, v. 84, p. 221-236, 1986.
- KOTZE, A. C.; O'GRADY, J.; GOUGH, J. M.; PEARSON, R.; BAGNALL, N. H.; KEMP, D. H.; AKHURST, R. J. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* to parasitic and free-living life-stages of nematode parasites of livestock. **International Journal for Parasitology**, Oxford, GB, v. 35, p. 1013-1022, 2005.

KRIEG, A.; LANGENBRUCH, G. A. Susceptibility of arthropod species to *Bacillus thuringiensis*. In: BURGESS, H. D. (Ed.). **Microbial control of pests and plant diseases 1970 - 1980**. London: Academic Press, 1981. p. 837-896.

LAMBERT, B.; BUYSSE, L.; DECOCK, C.; JANSSENS, S.; PIENS, C.; SAEY, B.; SEURINCK, J.; VAN AUDENHOVE, K.; VAN RIE, J.; VAN VLIET, A.; PEFEROEN, M. A *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein with a high activity against members of the family Noctuidae. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 62, n. 1, p. 80-6, 1996.

LEE, M. K.; JENKINS, J. L.; YOU, T. H.; CURTISS, A.; SON, J. J.; ADANG, M. J.; DEAN, D. H. Mutations at the arginine residues in alpha-8 loop of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1Ac affect toxicity and binding to *Manduca sexta* and *Lymantria dispar* aminopeptidase N. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 497, n. 2-3, p. 108-112, 2001.

LIGHTWOOD, D. J. **Potency determinants of the *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins**. 1999. 284 p. Thesis (Doutorado) - University of Cambridge, Department of Biochemistry, Cambridge.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, US, v. 193, p. 265-275, 1951.

MIDOH, N.; OYAMA, K. ***Bacillus thuringiensis cry* gene for insecticidal crystal protein**: Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer>>. Entrez AB011496. Acesso em: maio 2006. Unpublished work.

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.; SIQUEIRA, C. B.; SILVA-WERNECK, J. O.; BERRY, C. Screening of Brazilian *Bacillus thuringiensis* isolates active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatilis*. **Biological control**, Orlando, US, v. 41, p. 291-295, 2007.

PIGOTT, C. R.; ELLAR, D. J. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 71, n. 2, p. 255-281, 2007.

POSPIESCH, A.; NEUMANN, B. A versatile quick-prep of genomic DNA from Gram-positive bacteria. **Trends in Genetics: DNA Differentiation & Development**, Amsterdam, v. 11, n. 6, p. 217-218, 1995.

RUIU, L.; DELRIO, G.; ELLAR, D. J.; FLORIS, I.; PAGLIETTI, B.; RUBINO, S.; SATTA, A. Lethal and sublethal effects of *Brevibacillus laterosporus* on the housefly (*Musca domestica*). **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, NL, v. 118, p. 137-144, 2006.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D. R.; DEAN, D. H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 62, n. 3, p. 775-806, 1998.

SHEVELEV, A. B.; SVARINSKY, M. A.; KARASIN, A. I.; KOGAN YA, N.; CHESTUKHINA, G. G.; STEPANOV, V. M. Primary structure of *cryX***, the novel delta-endotoxin-related gene from *Bacillus thuringiensis* spp. *galleriae*. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 336, n. 1, p. 79-82, 1993.

STEWART, G. S. A. B.; JOHNSTONE, K.; HAGELBERG, E.; ELLAR, D. J. Commitment of bacterial spores to germinate. A measure of the trigger reaction. **Biochemistry Journal**, v. 196, p. 101-106, 1981.

THOMAS, W. E.; ELLAR, D. J. *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* crystal δ -endotoxin: effects on insect and mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Cell Science**, London, v. 60, p. 181-197, 1983.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. Clustal W - Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, London, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from acrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 76, p. 4350-4354, 1979.

VILCHEZ, S.; JACOBY, J.; ELLAR, D. J. Display of biologically functional insecticidal toxin on the surface of lambda phage. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 70, n. 11, p. 6587-6594, 2004.

WARD, E. S.; ELLAR, D. J. Assignment of the δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* to a specific plasmid by curing analysis. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 158, p. 45-49, 1983a.

WARD, E. S.; ELLAR, D. J. Assignment of the δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* to a specific plasmid by curing analysis. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 158, p. 45-49, 1983b.

WOLFERSBERGER, M.; LUETHY, P.; MAURER, A.; PARENTI, P.; SACCHI, F. V.; GIORDANA, B.; HANOZET, G. M. Preparation and partial characterization of amino acid transporting brush border membrane vesicles from the larval midgut of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). **Comparative Biochemistry and Physiology. Molecular and integrative physiology. Part A**, New York, v. 86A, n. 2, p. 301-308, 1987.

ZHAO, J. Z.; CAO, J.; COLLINS, H. L.; BATES, S. L.; ROUSH, R. T.; EARLE, E. D.; SHELTON, A. M. Concurrent use of transgenic plants expressing a single and two *Bacillus thuringiensis* genes speeds insect adaptation to pyramided plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 102, n. 24, p. 8426-8430, 2005.

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