



***Bacillus thuringiensis* como agente de controle biológico**



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Agrobiologia

Ministério da Agricultura e do Abastecimento

República Federativa do Brasil

Presidente

Fernando Henrique Cardoso

Ministério da Agricultura e do Abastecimento

Ministro

Francisco Turra

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa

Diretor Presidente

Alberto Duque Portugal

Diretores

Elza Ângela Battaggia Brito da Cunha

Dante Daniel Giacomelli Scolari

José Roberto Rodrigues Peres

Chefias da Agrobiologia

Chefe Geral: Maria Cristina Prata Neves

Chefe Adj. de Pesq. e Desenvolvimento: Sebastião Manhães Souto

Chefe Adjunto Administrativo: Vanderlei Pinto

DOCUMENTO Nº 54

ISSN 0104-6187

Novembro 1998

***Bacillus thuringiensis* como agente de controle biológico**

Joana Falcão Salles
José Ivo Baldani

Seropédica - RJ
1998

Exemplares desta publicação podem ser solicitados à:

Embrapa Agrobiologia

Caixa Postal 74505

23851-970 - Seropédica – RJ

Telefone: (021) 682-1500

Fax: (021) 682-1230

E-mail: sac@cnpab.embrapa.br

Expediente:

Revisor ad hoc: Altair Toledo de Machado

Normalização Bibliográfica/Confecção/Padronização: Dorimar dos Santos Felix

Comitê de Publicações: Sebastião Manhães Souto(Presidente)

Johanna Döbereiner

José Ivo Baldani

Norma Gouvêa Rumjanek

José Ramos Pereira

Paulo Augusto da Eira

Dorimar dos Santos Felix(Bibliotecária)

SALLES, J.F.; BALDANI, J.I. *Bacillus thuringiensis* como agente de controle biológico. Seropédica: Embrapa *Agrobiologia*, nov. 1998. 31p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 54).

ISSN 0104-6187

1. Bactéria. 2. Controle biológico. 3. *Bacillus thuringiensis*. I. Baldani, J.I., colab. II. Embrapa. Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia (Seropédica, RJ). III. Título. IV. Série.

CDD 579.362

***Bacillus thuringiensis* como agente de controle biológico**

JOANA FALCÃO SALLES ¹

JOSÉ IVO BALDANI ²

(1) MSc em Agronomia, área de concentração em Fitotecnia, UFRRJ

(2) PhD em Agronomia, área de concentração Ciência do Solo, Texas A&M

SUMÁRIO

	Páginas
1. Introdução.....	3
2. Classes dos genes cry	5
2.1. <i>cryI</i>	5
2.2. <i>cryII</i>	5
2.3. <i>cryIII</i>	6
2.4. <i>cryIV</i>	6
2.5. <i>cryV</i>	7
3. Expressão dos genes cry	7
4. Modo de ação das δ -endotoxinas.....	10
4.1. Estrutura	10
4.2. Solubilização e ativação	12
4.3. Ligação ao receptor	12
4.4. Formação das lesões tóxicas.....	13
5. Formas de utilização das proteínas Cry	14
5.1. Uso direto de <i>B. thuringiensis</i>	14
5.2. Plantas transgênicas.....	15
5.3. Microrganismos transgênicos.....	20
6. Considerações finais.....	23
7. Referências bibliográficas	25

1. Introdução:

Bacillus thuringiensis é o principal agente de controle biológico utilizado atualmente, sendo responsável por aproximadamente 2% do mercado mundial de inseticidas (LAMBERT *et al.*, 1992). A sua atividade entomopatogênica está relacionada com a produção de cristais com ação inseticida, que são sintetizados a partir da fase estacionária e acumulados no compartimento da célula mãe durante a esporulação, podendo corresponder a até 25% do peso seco de células (AGAISSE & LERECLUS, 1995). Cada cristal pode ser formado por uma ou mais proteínas codificadas pelos genes *cry* e conhecidas como δ -endotoxinas ou proteínas cristal. HÖFTE & WHITELEY (1989) classificaram 42 diferentes tipos de δ -endotoxina em 14 grupos, de acordo com a atividade biológica dos produtos dos genes *cry* e com sua seqüência de aminoácidos. Desta forma, as toxinas codificadas pelos genes *cryI*, *cryII*, *cryIII* e *cryIV* são específicas para as ordens Lepidoptera; Diptera e Lepidoptera; Coleoptera e Diptera, respectivamente.

O isolamento de novas estripes de *B. thuringiensis* e identificação de genes *cry* que codificam para δ -endotoxinas com diferentes espectros de ação, que não se enquadravam no sistema de classificação proposto por HÖFTE & WHITELEY (1989), levou a criação de uma nova nomenclatura baseada somente na identidade dos aminoácidos das proteínas Cry, proposta por CRICKMORE *et al.* (1995). Nesta nova classificação, 96 seqüências gênicas da δ -endotoxina foram agrupadas em 17 grupos (PEFEROEN, 1997) e os números romanos foram substituídos por números arábicos (quadro1), como é o caso dos genes *cryIA(a)*, *cryIB* e *cryIIIA* que foram classificados como *cry1Aa*, *cry1Ba* e *cry3A*, respectivamente. Entretanto alguns genes tiveram seus números alterados, como ocorreu com os genes *cryIH* e *cryIIIC*, que foram classificados como *cry9Ca* e *cry7Aa* (ver http://www.biols.susx.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/). Apesar desta nova nomenclatura ter sido publicada recentemente, foi feita uma revisão sobre a antiga por esta ser mais didática (item 2).

Quadro1: Relação entre a nova nomenclatura dos genes *cry* (CRIKMORE *et al.*, 1998) e a antiga classificação proposta por HÖFTE & WITHELEY (1989).

Nova classificação	Classificação antiga	Inseto alvo
Cry1Aa1	CryIA(a)	Lepidoptera
Cry1Ab1	CryIA(b)	Lepidoptera
Cry1Ac1	CryIA(c)	Lepidoptera
Cry1Ad1	CryIA(d)	Lepidoptera
Cry1Ba1	CryIB	Lepidoptera/Coleoptera
Cry1Ca1	CryIC	Lepidoptera
Cry1Ea1	CryIE	Lepidoptera
Cry1Ia1	CryV	Lepidoptera/Coleoptera
Cry2Aa1	CryIIA	Lepidoptera/Diptera
Cry2Ac1	CryIIC	Lepidoptera
Cry3Aa1	CryIIIA	Coleoptera
Cry3Ca1	CryIIID	Coleoptera
Cry4Ba1	CryIVB	Coleoptera
Cry7Aa1	CryIIIC	Coleoptera
Cry8Aa1	CryIIIE	Coleoptera
Cry9Aa1	CryIG	Lepidoptera
Cry10Aa1	CryIVC	Diptera
Cry11Aa1	CryIVD	Diptera
Cry12Aa1	CryVB	Nematoda
Cry13Aa1	CryVC	Nematoda
Cry14Aa1	CryVD	Coleoptera

Fonte: PEFEROEN, 1997.

2. Classes de genes *cry* (HÖFTE & WHITELEY, 1989):

2.1. *cryI*

Os genes *cryI* codificam para proteínas com peso molecular de 130 a 140 kDa, que se acumulam na célula mãe na forma de cristais bipiramidais, durante a fase de esporulação. Após a solubilização destes cristais em pH alcalino, ocorre a liberação da protoxina, que é ativada por proteases presentes no intestino médio das larvas, liberando o fragmento tóxico com tamanho variável de 60 a 70 kDa (HÖFTE & WHITELEY, 1989).

Esta classe contém 6 subclasses de genes (*cryIA a F*), com identidade de aminoácidos superior a 55% (HÖFTE & WHITELEY, 1989). A porção C-terminal é bastante conservada entre os genes *cryI* e não está envolvida com a toxicidade. Em função do seu elevado número de resíduos de cisteína, acredita-se que esta região contribua para a estabilidade do cristal, através da formação de pontes de enxofre (AGAISSE & LERECLUS, 1995). Já a porção N-terminal das proteínas CryI é mais variável e corresponde ao fragmento tóxico. Esta região é composta por 5 blocos extremamente conservados entre as proteínas CryI, CryIII, CryIV (A,B e C) e CryV.

2.2. *cryII*

A δ -endotoxina codificada pelos genes *cryII* tem peso molecular de 71 kDa e forma cristais cubóides. A proteína CryIIA possui duplo espectro de ação (Lepidoptera e Diptera), enquanto as demais proteínas desta classe têm apresentado toxicidade somente para insetos da ordem Lepidoptera (HÖFTE & WHITELEY, 1989). As proteínas CryIIA, B e C possuem 80 a 90% de identidade de aminoácidos entre si, e diferem da classe CryI por não possuírem a porção C-terminal e só apresentarem o primeiro bloco conservado na porção N-terminal (LERECLUS *et al.*, 1993).

2.3. *cryIII*

As estirpes de *B. thuringiensis* que contêm a classe *cryIII* apresentam atividade contra insetos da ordem Coleoptera. Seus cristais possuem forma romboidal e são compostos por uma única proteína de 72 kDa, exceto a proteína CryIIIC, cuja massa molecular é de 130 kDa (LAMBERT *et al.*, 1992). A remoção de 57 aminoácidos da porção N-terminal desta proteína por proteases associadas ao esporo, gera um peptídeo tóxico de 66 kDa (McPHERSON *et al.*, 1988). As proteínas CryIII são homólogas a porção amino-terminal das proteínas CryI, contendo os 5 blocos conservados, entretanto a porção carboxi-terminal presente nas protoxinas da classe I se mostra ausente na maior parte das proteínas desta classe, com exceção da proteína CryIIIC (LAMBERT *et al.*, 1992). A análise cristalográfica da proteína CryIIIA revelou a presença de 3 domínios distintos da toxina na sua forma ativa (LI *et al.*, 1991). O domínio I estaria envolvido na formação do poro, o domínio II na especificidade e na ligação da proteína aos receptores e o domínio III na estabilidade, formação do poro e especificidade da toxina (SCHNEPF, 1995).

Esta classe de δ -endotoxina difere das demais quanto a sua expressão. De acordo com De-SOUZA *et al* (1996), o promotor de gene *cryIIIA* é ativo no final da fase exponencial e é reconhecido por um fator sigma (σ^A) específico da fase vegetativa.

2.3. *cryIV*

A classe *cryIV* foi isolada a partir de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*, apresenta cristais de forma composta: esférica e retangular, com atividade contra larvas de Diptera. Esta classe compreende quatro genes (*cryIVA*, *B*, *C* e *D*), que codificam para proteínas de peso molecular de 135, 128, 74 e 72 kDa, respectivamente (LERECLUS *et al.*, 1993). *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* também produz uma proteína de 27 kDa com atividade citolítica, que por não apresentar homologia com as δ -endotoxinas, foi classificada como Cyt. Esta proteína também está presente no cristal e é necessária para que este apresente toxicidade (LERECLUS *et al.*, 1993). De acordo com DERVYN *et al.* (1995), as proteínas CryIVA, CryIVB, CryIVD e CytA correspondem a 5; 5; 35 e 55 % do cristal de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*.

2.4. *cryV*

Esta classe foi incluída na classificação de HÖFTE e WHITELEY (1989) recentemente, após a clonagem de um novo gene com atividade contra insetos das ordens Lepidoptera e Coleoptera, designado como *cryV* (TAILOR *et al.*, 1992). GLEAVE *et al.* (1993), utilizando a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) com primers específicos para esta classe de gene, detectaram a sua presença em 7 dos 21 serotipos de *B. thuringiensis* testados, incluindo *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* DSIR732 e *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* HD-112. Estes autores sequenciaram o gene *cryV* de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* DSIR732 (*cryV*₇₃₂), e após comparação deste com aquele descrito por TAILOR *et al.* (1992), verificaram diferença somente em dois nucleotídeos. A proteína CryV₇₃₂ possui massa estimada de 81.215 Da e possui os 5 blocos conservados na porção amino-terminal, assim como um sítio de clivagem potencial entre os aminoácidos 637 e 638. A clivagem da protoxina CryV₇₃₂ neste ponto, por proteases do intestino do inseto, gera o fragmento tóxico de aproximadamente 65 kDa. Resultados de bioensaios utilizando a proteína de 81 kDa revelaram sua toxicidade somente contra *Epiphyas postvittana* (Lepidoptera), não sendo detectado nenhum efeito contra larvas de *Tenebrio molitor* (Coleoptera) ou *Culex pervigilans* (Diptera) (GLEAVE *et al.*, 1993).

3. Expressão dos genes *cry*

As δ -endotoxinas são sintetizadas durante a fase de esporulação e se acumulam na célula mãe sob a forma de cristais, que em condições de laboratório, chegam a corresponder a um total de 0,5 mg de proteína/ml, o equivalente a até 25% das proteínas totais (AGAISSE & LERECLUS, 1995). Para que seja alcançado este valor, são necessárias de 10^6 a 2×10^6 moléculas da toxina, e essa produção maciça ocorre devido a um maquinário especial, que no caso de *B. thuringiensis* envolve mecanismos transcricionais e pós-transcricionais (AGAISSE & LERECLUS, 1995).

Um dos mecanismos transcricionais consiste na expressão de um gene, sob o controle de um promotor forte, em uma célula que não sofrerá nenhum tipo de divisão. Em *B. thuringiensis*, a δ -endotoxina é sintetizada durante a fase de esporulação e a maioria dos genes *cry* estão sob o controle de promotores ativados nesta fase. Estudos da regulação gênica de *B. subtilis* revelaram que o processo de esporulação é controlado espacial e temporalmente pela ativação sucessiva de 6 fatores sigma (σ) (ADAMS *et al.*, 1991). O primeiro fator sigma a ser ativado é σ^A , específico da fase vegetativa. Os demais fatores expressos na fase de esporulação são chamados de σ^H , σ^F , σ^E , σ^G e σ^K , de acordo com a ordem de ativação (AGAISSE & LERECLUS, 1995).

Um exemplo típico de expressão gênica dependente de esporulação em *B. thuringiensis* é o gene *cryIA*, no qual foram identificados dois promotores sobrepostos (BtI e BtII). A atividade destes promotores foi monitorada através de uma fusão do genes *cryIA(a)* e *lacZ* e observou-se uma elevada atividade da β -galactosidase, o que sugere que os promotores envolvidos na transcrição de gene *cryIAa* são muito fortes (AGAISSE & LERECLUS, 1995). O promotor BtI é reconhecido pelo fator σ^{35} , sendo ativado entre t_2 e t_6 (t_n corresponde ao número de horas após o final da fase de crescimento exponencial), enquanto BtII é reconhecido pelo fator σ^{28} e é ativado após t_5 . A seqüência de aminoácidos dos fatores σ^{35} e σ^{28} , deduzida a partir da seqüência codante dos genes correspondentes, revelou que estes apresentam 88 e 85% de identidade com os fatores σ^E e σ^K de *B. subtilis*, respectivamente (ADAMS *et al.*, 1991).

Outros genes que codificam para a δ -endotoxina são dependentes de esporulação. Os genes *cry4A*, *cry4B*, *cry11A* e *cry1B*, assim como o gene *cyt1A*, também são transcritos por promotores múltiplos e ativados pelos fatores σ^{28} e σ^{35} (DERVYN, *et al.*, 1995; BROWN & WHITELEY, 1990). No caso dos genes *cry2A* e *cry15A*, a transcrição ocorre a partir de um único promotor reconhecido pelo fator σ^{35} (BROWN & WHITELEY, 1990; BROWN, 1993).

O gene *cry3A* é um exemplo de gene *cry* não dependente de esporulação. Estudos realizados a partir da fusão da seqüência promotora do gene *cry3A*, com o gene repórter *lacZ* mostraram que a atividade da β -galactosidase pode ser detectada a partir de t_{-2} , ou seja

2 horas antes do início da esporulação, e que esta atividade atinge o máximo em t_6 (DESOUZA *et al.*, 1993). LERECLUS *et al.* (1995) desenvolveram mutantes Spo0A de *B. thuringiensis* (cuja esporulação foi bloqueada em t_0) e após a clonagem do gene *cry3A*, observaram que estes mutantes eram capazes de produzir a toxina e em quantidade superior a estirpe selvagem, indicando que a ativação da expressão do gene *cry3A* ocorre independentemente da esporulação ou de fatores σ específicos desta fase. Segundo DESOUZA *et al.* (1996), a região promotora deste gene apresenta alta identidade com a seqüência consenso reconhecida pelo fator σ^A , ativo principalmente na fase vegetativa.

A estabilidade do RNA mensageiro dos genes *cry* é outro fator responsável pelos altos níveis de síntese destes genes, cuja meia-vida pode ser de até 10 minutos (GLATRON & RAPOPORT, 1972). WONG & CHANG (1986) identificaram um retroregulador positivo responsável pelo aumento de expressão do gene *cry* de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*. Este retroregulador está localizado na porção 3' da região não codificadora do gene *cry1Aa* e coincide com o seu terminador transcricional. A transcrição desta região leva a formação de uma estrutura em alça, que protege a extremidade 3' do RNA mensageiro da degradação por exonucleases. Estes autores observaram, após fusão desta seqüência terminadora com genes heterólogos, que esta era capaz de estabilizar o RNA mensageiro de genes cotranscritos, e que esta característica era observada tanto em bactérias gram-negativas (*E. coli*) como gram-positivas (*B. subtilis*). Outra seqüência, que foi observada na região 5' dos genes *cry3A*, *cry3Ba* e *cry3Bb* e corresponde ao nucleotídeo -129 (referente ao codon inicial do gene *cry3A*), contém uma seqüência consenso "Shine-Delgarno". Esta região, ao interagir com a porção 3' da sub-unidade menor do RNA ribossomal, estabiliza o RNA mensageiro dos genes *cry* (AGAISSE & LERECLUS, 1995).

Um fator pós-transcricional regulando a expressão de genes *cry* foi observado em *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*. ADAMS *et al.* (1989) observaram que a presença de um fragmento de 0,8 kb upstream ao gene *cyt* era essencial para sua elevada expressão. A análise deste fragmento revelou a presença de uma ORF ("Open Reading Frame") que codifica para uma proteína de 20 kDa. A presença desta região, tanto em *cis* como em *trans*, promoveu um aumento na quantidade de proteína Cyt produzida, entretanto, não houve aumento significativo no seu RNA mensageiro, indicando que o efeito da proteína

de 20 kDa é pós-transcricional. Estes autores detectaram ainda que o início da transcrição da proteína de 20 kDa ocorre 2 horas (t_0) antes da transcrição da proteína Cyt (t_2) e que a partir deste ponto ambas as proteínas são produzidas.

O número de cópias de um gene também influencia a sua expressão. Desta forma, genes localizados em plasmídeos são normalmente expressos em maior quantidade devido ao elevado número de cópias destas estruturas na célula. Em *B. thuringiensis*, o número de plasmídeos pode variar de 1 a 16, sendo que estes ainda variam quanto ao tamanho. A maioria dos genes *cry* estão localizados em plasmídeos de alta massa molecular de baixo número de cópias, e somente 3 subespécies de *B. thuringiensis* não possuem plasmídeos contendo o gene *cry* (LERECLUS *et al.*, 1989).

Algumas estirpes de *B. thuringiensis* apresentam mais de uma cópia do gene *cry*, como é o caso de *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* 7.29. Esta estirpe possui 2 cópias do gene *cryIAb*, uma cópia localizada em um plasmídeo de 45 MDa e outra no cromossomo. Já os genes *cryIC* e *cryID* estão próximos e localizados no cromossoma, assim como o gene *cryIAa* (LERECLUS *et al.*, 1989). Ao contrário desta estirpe, aquelas pertencentes a subespécie *israelensis* contém todos os genes localizados em um plasmídeo de 72 MDa.

4. Modo de ação das δ -endotoxinas

4.1. Estrutura

A primeira δ -endotoxina a ter sua estrutura molecular determinada foi a proteína Cry3A (LI *et al.*, 1991). A análise cristalográfica obtida a partir da forma ativa da toxina revelou a presença de 3 domínios distintos, originados a partir dos 5 blocos conservados presentes na maioria das proteínas Cry (LI *et al.*, 1991). O domínio I compreende a porção amino-terminal até o resíduo 290 e contém o bloco 1 e uma parte do bloco 2. Este domínio é formado por um feixe de 7 α -hélices anfipáticas, onde a hélice central se mostra completamente cercada pelas demais, e está envolvido na inserção da toxina na membrana, formação do poro e manutenção da ligação da toxina ao receptor, pois foi demonstrado que

a ocorrência de mutações na hélice α_3 da proteína Cry1A pode acarretar perda de toxicidade devido a uma redução na irreversibilidade desta ligação (HUSSAIN, *et al.*, 1996). O domínio II contém os resíduos 291 a 500, compreendendo parte do bloco 2 e parte do bloco 3, e é formado por 3 folhas β -pregueadas antiparalelas. Esta região é a menos conservada entre as δ -endotoxinas e é responsável pela ligação aos receptores. O 3º domínio é formado por parte do bloco 3 e os blocos 4 e 5 e é composto por um sanduíche de 2 folhas β -pregueadas antiparalelas. Acredita-se que este domínio seja importante na manutenção da integridade estrutural ou estabilidade das proteínas (KNOWLES & DOW, 1993; LI *et al.*, 1991; LI, 1996) e que no caso da proteína Cry1Aa, também esteja envolvido na formação do poro na membrana do intestino médio dos insetos (SCHWARTZ *et al.*, 1997).

BOSH *et al.* (1994) desenvolveram híbridos das proteínas Cry1C e Cry1E, nos quais a recombinação ocorreu entre os domínios II e III. Apesar da proteína Cry1E não possuir atividade para *Spodoptera exigua*, a proteína híbrida Cry1E-Cry1C apresentou a mesma toxicidade que a proteína natural (Cry1C). Estes autores sugerem que o domínio III está envolvido na especificidade da toxina Cry1C contra *Spodoptera exigua*, sendo necessário para estabilizar a proteína Cry1E no intestino dos insetos, e que o domínio II está envolvido com a ligação ao receptor pois tanto o híbrido Cry1E-Cry1C como a proteína Cry1E reconheceram o mesmo receptor, que difere daquele receptor reconhecido pelas proteínas Cry1C e Cry1C-Cry1E.

Devido a presença de blocos altamente conservados na maioria das δ -endotoxinas, acreditava-se que todas as proteínas Cry tivessem a mesma conformação da proteína Cry3A. Esta teoria foi confirmada com a determinação da estrutura da proteína CryIA(a) (GROCHULSKI *et al.*, 1995). De acordo com LI (1996), esta toxina tem conformação semelhante a toxina Cry3A e apresentam 41, 35 e 23% de identidade com os domínios III, I e II, respectivamente. Recentemente, a análise cristalográfica incompleta da proteína Cry2A revelou que apesar da ausência dos blocos 3, 4 e 5 nesta toxina, esta possui estrutura semelhante às proteínas Cry3A e Cry1A (SCHNEPF *et al.*, 1998).

4.2. Solubilização e ativação

Os cristais protéicos produzidos pelo *B. thuringiensis* são compostos por uma ou mais δ -endotoxinas na sua forma inativa (protoxina). Após a ingestão dos cristais, ocorre o primeiro passo do modo de ação das δ -endotoxinas, que consiste na solubilização das protoxinas pelo pH alcalino do intestino médio dos insetos. As proteínas específicas para a ordem Lepidoptera são solúveis em pH acima de 9,5 (KNOWLES & DOW, 1993), o que está de acordo com o pH do intestino das larvas destes insetos, que varia de 9 a 12. Nos insetos da ordem Coleoptera, o pH do intestino é ligeiramente ácido (em torno de 6,0), entretanto a proteína Cry3A, específica para esta ordem, é solúvel em pH abaixo de 3,5 e acima de 9,5. Em função deste fato, outros fatores como detergentes ou a redução do potencial do intestino também devem atuar na solubilização (BIETLOT *et al.*, 1990).

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

4.3. Ligação ao receptor

Após a ativação das toxinas, estas passam através dos poros da membrana peritrófica e interagem com as células epiteliais do intestino do inseto, que contém receptores. A afinidade destas estruturas pelas proteínas Cry é variável, com valores de K_d entre 10^{-7} e 10^{-10} M (GILL, *et al.*, 1992). O padrão de ligação a estes receptores também é bastante variável, já que uma única proteína pode ter afinidade por mais de um receptor ou um único receptor pode ter afinidade por mais de uma proteína (KNOWLES, 1994). A ligação

das toxinas aos receptores é importante porém não é um fator determinante de patogenicidade, pois como foi mostrado por GARCZYNSKI *et al.* (1991), apesar da tolerância de *Spodoptera frugiperda* a proteína Cry1Ac, ocorre ligação desta toxina aos receptores presentes em “BBMV” (“Brush Border Membrane Vesicles”) do intestino deste inseto. Segundo SANCHIS *et al.* (1994), a atividade larvicida não está correlacionada necessariamente com a concentração ou a afinidade do receptor pela δ -endotoxina.

A função normal destes receptores ainda não foi estabelecida e acredita-se que estes sejam proteínas glicosiladas com peso molecular de 64 a 155 kDa (GARCZYNSKI *et al.*, 1991). Em *Manduca sexta*, a proteína responsável pela ligação de Cry1Ac na membrana do intestino médio deste inseto é uma aminopeptidase N com peso molecular de 120 kDa (GARCZYNSKI & ADANG, 1995). O receptor da proteína Cry1Ac encontrado em células do intestino de *Limantria dispar*, também é uma aminopeptidase N que apresenta um alto grau de similaridade com o receptor de *M. sexta* (VALAITIS *et al.*, 1995).

4.4. Formação da lesão tóxica

Segundo o modelo descrito por GILL *et al.* (1992), as δ -endotoxinas se ligam irreversivelmente aos receptores e após alteração conformacional da proteína, o seu domínio tóxico se insere na membrana plasmática. Ocorre então oligomerização, formação do poro e lise celular. De acordo com a estrutura da proteína Cry3A, o domínio I desta toxina contém α -hélices anfipáticas cujo comprimento é suficiente para permitir a penetração na membrana (LI *et al.*, 1991). Em um dos modelos (“penknife”) propostos para a inserção da toxina, as hélices $\alpha 5$ e $\alpha 6$ penetrariam na membrana e o poro seria formado pela oligomerização de um número de moléculas da toxina. Neste caso não haveria alteração conformacional da proteína. Em outro modelo (“umbrella”), os pares de hélices envolvidos seriam $\alpha 6$ e $\alpha 7$ ou $\alpha 4$ e $\alpha 5$. Após a inserção das hélices em forma de grampo na membrana, haveria um rearranjo no domínio I da toxina e criação do poro, que seria formado por oligomerização ou por inserção posterior de outras hélices da mesma molécula (KNOWLES, 1994). De acordo com GAZIT & SHAI (1995), $\alpha 7$ funcionaria como um

sensor de ligação que iniciaria a interação das α -hélices da toxina com a membrana, se ligando posteriormente a esta, e $\alpha 5$ penetraria na membrana para formação do poro. Segundo SCHWARTZ *et al.* (1997), este modelo é mais provável que o primeiro pois a região do bloco 4 que está envolvida na permeabilização da membrana estaria mais próxima estruturalmente das hélices $\alpha 4$ e $\alpha 5$.

O poro formado pela inserção da δ -endotoxina na membrana apresenta um raio de aproximadamente 0,6 nm (KNOWLES & ELLAR, 1987) e permite um rápido fluxo de íons. KNOWLES & DOW (1993) propuseram um modo de ação da toxina para insetos pertencentes a ordem Lepidoptera, onde o influxo de K^+ e o efluxo de H^+ causam a despolarização da membrana apical e aumento do pH intracelular. Estes dois fatores levam ao fechamento da ligação das células colunares com as células companheiras, onde a capacidade de bombardeamento de K^+ para o lúmen do intestino começa a ser superado pelo influxo de íons K^+ . A bomba de K^+ pára de funcionar, as células companheiras encolhem e as células colunares incham, lisando osmoticamente. Esta lise celular leva ao rompimento da integridade do intestino médio e o inseto morre por inanição ou septicemia. Este modelo não é válido para insetos das ordens Coleoptera e Diptera pois estes não possuem as células companheiras. Apesar deste fato, o mecanismo de ação deve ser semelhante já que só foi detectada a presença de receptores nas células colunares.

5. Formas de utilização das proteínas Cry:

5.1. Uso direto de *B. thuringiensis*

B. thuringiensis foi descoberto no início do século e a partir de década de 20 começou a ser produzido em grandes quantidades visando o controle de insetos (Van FRANKENHUYSEN, 1993). Tanto naquela época como nos dias atuais, a aplicação direta dos cristais e esporos de *B. thuringiensis* representa a principal forma de utilização das proteínas Cry.

Apesar da crescente utilização desta bactéria como agente de controle biológico, a sua aplicação direta no campo apresenta algumas desvantagens que limitam seu uso, como a faixa restrita de insetos hospedeiros, ou seja, o uso de uma única espécie de *B. thuringiensis* normalmente impossibilita o controle de várias pragas, enquanto o inseticida químico eliminaria um número maior de insetos. Essa característica também pode ser considerada vantajosa pois diferentemente do agente químico, que controla não só populações de insetos pragas, mas também de insetos benéficos, o agente biológico tem ação contra uma única espécie ou contra um número restrito de espécies, não interferindo nas outras populações (Van FRANKENHUYSEN, 1993). Outra característica desfavorável do uso convencional de *B. thuringiensis* está relacionada ao seu baixo efeito residual nas folhas, solo e água, o que encarece a sua utilização devido a necessidade de um número maior de aplicações (GELERNTER & SCHWAB, 1993). A determinação da época correta de aplicação do *B. thuringiensis*, cuja toxicidade diminui a medida que as larvas mudam de ínstar, também é um fator limitante da sua utilização (van FRANKENHUYSEN, 1993). A incapacidade dos cristais de δ -endotoxina penetrarem no interior das plantas ou no solo também restringe o uso deste agente biológico, pois impossibilita o controle de pragas que se alimentam de tecidos internos das plantas ou de raízes (GELERNTER & SCHWAB, 1993).

As desvantagens da aplicação direta de *B. thuringiensis* e o fato de cada tipo de δ -endotoxina ser codificada por um único gene, levaram ao desenvolvimento de produtos biotecnológicos obtidos a partir da transferência de genes *cry* para plantas ou outros microrganismos. Estes organismos transgênicos visam principalmente o aumento da eficiência das δ -endotoxinas.

5.2. Plantas transgênicas

A introdução de genes da δ -endotoxina em plantas foi um dos primeiros projetos na área de biotecnologia vegetal. Estes projetos visam principalmente aumentar a eficiência

desta toxina, eliminando características desfavoráveis do *B. thuringiensis*, como seu elevado custo de aplicação devido a baixa persistência dos cristais, e a incapacidade de penetrar nos tecidos vegetais internos. Atualmente, mais de 50 espécies de plantas foram transformadas com o gene da δ -endotoxina, muitas delas visando o controle de pragas resistentes a pesticidas químicos (Quadro 2) e no Brasil, plantas transgênicas de milho expressando o gene *cry1Ab* de *B. thuringiensis*, já se encontram em fase de testes de campo.

Quadro 2: Plantas transformadas com genes *cry* de *Bacillus thuringiensis* em processo de comercialização

Planta transformada		Inseto alvo
Nome comum	Nome científico	
Soja	<i>Glycine canescens</i>	<i>Anticarsia gemmatalis</i>
Laranja	<i>Citrus sinensis</i>	<i>Lymantria dispar</i>
Algodão	<i>Gossypium hirsutum</i>	<i>Heliothis</i> sp.
Tabaco	<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>Manduca Sexta</i>
Alfafa	<i>Mendicago sativa</i>	<i>Spodoptera</i> spp.
Canola	<i>Brassica napus</i>	<i>Agrotis</i> spp.
Milho	<i>Zea mays</i>	<i>Ostrinia nubilalis</i>
Milho	<i>Zea mays</i>	<i>Spodoptera frugiperda</i>
Milho	<i>Zea mays</i>	<i>Helicoverpa zea</i>
Arroz	<i>Oryza sativa</i>	<i>Chilo</i> spp.
Arroz	<i>Oryza sativa</i>	<i>Spodoptera</i> spp.
Batata	<i>Solanum tuberosum</i>	<i>Manduca</i> spp.

Fonte: ELY, 1993.

Uma das primeiras plantas a serem transformadas com o gene da δ -endotoxina foi o tabaco. VAECK *et al.* (1987) utilizaram a seqüência inteira ou a versão truncada (somente o porção N-terminal) do gene *cry* de *B. thuringiensis* subsp. *berliner* 1715, sob o controle

do promotor TR de *Agrobacterium*, na transformação destas plantas, e observaram que aquelas transformadas com a versão truncada do gene *cry* sintetizavam 10 vezes mais toxina que as plantas contendo o gene completo. Estes autores verificaram que a quantidade máxima de δ -endotoxina detectada representava 0,02% do total de proteínas solúveis. Não foi observada atividade inseticida nas plantas transformadas com o gene *cry* intacto, sendo a quantidade do seu RNA mensageiro 10 a 50 vezes menor que aquele obtido em plantas contendo versão truncada deste gene.

BARTON *et al.* (1987) transformaram plantas de tabaco com a versão original e uma versão truncada do gene *cry* de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 sobre o controle do promotor 35S de CaMV. A expressão da forma intacta da δ -endotoxina se mostrou letal para as plantas, enquanto a expressão da forma truncada produziu um baixo nível de RNA mensageiro em relação a outros genes expressos sob o controle do mesmo promotor, sugerindo que o transcrito da toxina era instável. Segundo MURRAY *et al.* (1991), uma das causas da baixa expressão de genes *cry* em plantas é a instabilidade do seu RNA mensageiro.

O genoma das plantas possui elevada porcentagem de bases G e C, enquanto os genes *cry* apresentam as bases A e T (64%) em maior quantidade, indicando que existe uma diferença, quanto ao códon preferencial, entre este gene e os genes expressos em plantas. Esta diferença pode diminuir a eficiência da tradução dos genes, principalmente devido a instabilidade do seu transcrito (Van AARSEN *et al.*, 1995). Com o intuito de aumentar a expressão da δ -endotoxina em plantas transformadas, KOZIEL *et al.* (1993) utilizaram uma versão truncada do gene *cry1Ab*, cuja seqüência foi alterada de forma a elevar a porcentagem de bases G e C de 38 para 65%. Plantas transgênicas de milho, expressando a versão sintética da proteína Cry1Ab, cuja a homologia com a proteína nativa é de 65 %, foram capazes de produzir de 1.500 a 4.000 η g de toxina por mg de proteína solúvel. As plantas testadas apresentaram altas taxas de mortalidade (100% em alguns casos) contra neonatas de *Ostrinia nubilalis*, em experimentos realizados em laboratório. Experimentos realizados em campo revelaram uma diminuição no comprimento dos túneis gerados por este inseto, de 59 cm na planta controle para 1,7 cm na planta transgênica. Em 1995, foram desenvolvidos híbridos a partir desta planta de milho transformada com o gene

cry, e testes de campo comparando estas com híbridos isogênicos sem o gene do *B. thuringiensis* revelaram que não havia diferença quanto a produção, e que o milho transgênico promovia 95% de redução nos danos causados por uma infestação pesada de *O. nubilalis* (CAROZZI & KOZIEL, 1997).

A mesma estratégia de alteração da porcentagem de G+C do gene *cry* foi utilizada por FUJIMOTO *et al.* (1993) para transformar plantas de arroz. Estes autores detectaram um nível elevado de RNA mensageiro correspondente ao gene *cry1Ab*, o que sugere que a alteração na seqüência do gene *cry* promoveu um aumento na estabilidade do seu transcrito. WÜNN *et al.* (1996) transformaram plantas de arroz com o gene *cry1Ab* nativo e o sintético (65% de homologia a nível de nucleotídeos) e observaram que somente este último era expresso. Experimentos realizados em casa de vegetação mostraram que 5 semanas após a infestação com larvas de *Scirpophaga incertulas*, foram detectadas larvas vivas somente nas plantas não transgênicas.

Visando a transformação de plantas com o gene *cry3A*, ADANG *et al.* (1993) alteraram o conteúdo de A+T deste gene de 65 para 55%, sendo eliminadas quaisquer seqüências que pudessem contribuir para a instabilidade do RNA mensageiro em eucarioto. Protoplastos de milho e cenoura foram eletroporados com o gene nativo e o sintético, porém análises de “Northern blot” revelaram que o RNA referente ao gene *cry* foi detectado somente em protoplastos contendo a versão sintética. Bioensaios realizados com plantas de batata transgênicas contendo o gene *cry3A* sintético mostraram que 92% das linhagens eram resistentes a larvas de primeiro ínstar de *Leptinotarsa decemlineata*.

PERLAK *et al.* (1993) desenvolveram plantas de batata contendo o gene *cry3A* e observaram que este era expresso nas folhas em uma quantidade que variava de 0,1 a 0,2% do total de proteínas. Estudos desenvolvidos a nível de campo com esta planta mostraram que esta estava protegida do ataque de larvas e adultos de *L. decemlineata*, e que a proteína Cry3A era produzida em grande quantidade durante toda a fase de desenvolvimento da planta (FELDMAN & STONE, 1997).

Recentemente McBRIDE *et al.* (1995) adotaram uma nova estratégia para aumentar a quantidade de δ -endotoxina produzida pelas plantas transgênicas, que consiste na introdução do gene *cry* em cloroplastos. Esta estratégia torna desnecessária a alteração da

porcentagem de bases já que o genoma destas estruturas é relativamente rico nas bases A e T. Estes autores demonstraram que plantas de tabaco expressando o gene *cryIAC* em cloroplastos, sob controle do promotor do operon do RNA ribossomal, eram capazes de acumular de 3 a 5% de proteína solúvel total na forma de δ -endotoxina. Bioensaios utilizando folhas deste material transgênico causaram 100% de mortalidade a *Helicoverpa virescens* e *H. zea*, e 90% de mortalidade a *Spodoptera exigua*.

A principal preocupação quanto a utilização de plantas transgênicas expressando a δ -endotoxina diz respeito a indução de resistência dos insetos devido a sua exposição contínua a esta proteína. Segundo SCHNEPF *et al.* (1998), algumas estratégias podem evitar o desenvolvimento de resistência, como a expressão da proteína Cry em altas doses, a criação de refúgios temporais e espaciais contendo plantas não transformadas e a utilização de várias proteínas com ligação a receptores distintos. Sendo a resistência um caráter recessivo ou co-dominante (aditivo), insetos resistentes heterozigotos são mais sensíveis que os homozigotos. Assim, a primeira estratégia está relacionada com a produção de δ -endotoxina em dose suficientemente grande para eliminar os insetos resistentes heterozigotos, diminuindo a prevalência do alelo de resistência (FELDMAN & STONE, 1997). A segunda estratégia refere-se ao fato de que a tolerância a δ -endotoxina deve ter algum custo para o inseto, já que é perdida quando não existe pressão de seleção (FELDMAN & STONE, 1997). Desta forma, a presença de plantas que não expressem o gene *cry* levam a uma diluição do alelo de resistência (DUCK & EVOLA, 1997). Com relação a utilização de várias proteínas, sabe-se que um dos fatores que determinam a resistência dos insetos a *B. thuringiensis* está relacionado com a ligação da toxina aos receptores presentes no intestino médio dos insetos (VAN RIE *et al.*, 1990) e que estes receptores são específicos para determinadas toxinas (BOSH *et al.*, 1994). Portanto a utilização de plantas expressando mais de um gene *cry* diminuiria a probabilidade de desenvolvimento de resistência, pois mesmo que o inseto adquira resistência a uma determinada proteína, em função de alguma alteração no seu receptor, a outra ainda permanecerá ativa. Outra estratégia interessante seria a expressão do gene *cry* em determinados tecidos da planta, o que pode ser obtido através da sua inserção em cloroplastos ou através da sua clonagem sob o controle de promotores como o da PEPC

(fosfoenolpiruvato carboxilase), promovendo a expressão somente em tecidos verdes, ou de promotores específicos de pólen ou do talo do milho (CAROZZI & KOZIEL, 1997; McBRIDE *et al.*, 1995).

5.3. Microrganismos transgênicos

O uso de microrganismos transgênicos contendo o gene *cry* como agentes de controle biológico possui algumas vantagens sobre a utilização de plantas expressando a δ -endotoxina. A relativa rapidez na obtenção dos recombinantes; um genoma com porcentagem de bases semelhante, sem a necessidade do uso de genes sintéticos; associado a facilidade de inoculação destes organismos nas áreas afetadas são algumas das características vantajosas desta estratégia.

As primeiras bactérias transgênicas a serem utilizadas como agentes de controle biológico foram *Pseudomonas fluorescens* e *Agrobacterium radiobacter*, nas quais o gene *cry1Ab* foi inserido no cromossoma, sob o controle de um promotor constitutivo (OBUKOWICZ *et al.*, 1986). Bioensaios realizados com *Manduca sexta*, onde 100 μ l de cultura na fase estacionária foram adicionados sobre dieta artificial, revelaram que as taxas de mortalidade foram de 50 e 100% para *A. radiobacter* e *P. fluorescens*, respectivamente. A quantidade de δ -endotoxina produzida pela espécie mais eficiente variou de 0,5 a 1% do total de proteínas solúveis. Ainda utilizando bactérias colonizadoras de rizosfera, HERRERA *et al.* (1994) promoveram a transferência do gene *cry1Ac* para *P. fluorescens*, através de plasmídeos de amplo espectro de hospedeiro (pDER405-cry ou pKT240-cry) ou de integração no cromossoma (pJFF350-cry). Apesar da diferença no número de cópias do gene nos transconjugantes contendo os plasmídeos ou no transconjugante contendo a inserção cromossômica, não houve diferença quanto a porcentagem de toxina produzida, que alcançou valores de 2,2 % (pDER405-cry, 13 cópias), 3,5 % (pKT240-cry, 28 cópias) e a 3,7 % (pJFF350-cry, 1 cópia) do total de proteínas solúveis. Acredita-se que a alta quantidade de proteína Cry1Ac produzida pelo transconjugante pJFF350 seja devido a deleção de um fragmento de 1,4 kb da região 5' do gene *cry*. Em função da sua

estabilidade, este transconjugante foi inoculado em plantas de cana-de-açúcar para ser testado em bioensaios contra larvas de *Eldana saccharina* e os resultados mostraram uma redução na porcentagem de internódios danificados de 33,5 no controle para 10,9 no transconjugante.

O controle de pragas que se alojam nos tecidos internos das plantas pode ser obtidos com o uso de bactérias transgênicas endófitas. LAMPEL *et al.* (1994) promoveram a integração do gene *cryIAC* no genoma de *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* e após a injeção de aproximadamente 10^7 UFC no meristema de plantas de milho, verificaram que os danos causados por *Ostrinia nubilalis*, avaliados através do número de túneis por planta e do seu comprimento, haviam sido reduzidos de 6,2 e 19,2 cm nas plantas controle para 2,8 e 6,1 cm nas plantas inoculadas com o transconjugante.

Diversos insetos dos gêneros *Sitonia*, *Cerotoma* e *Rivellia* são considerados herbívoros de nódulos e têm causado grandes prejuízos em plantas leguminosas devido ao seu hábito alimentar (BEZDICEK *et al.*, 1994). Uma estratégia para o controle destas pragas é a utilização de bactérias do tipo rizóbio contendo o gene da δ -endotoxina. SKOT *et al.* (1990) transferiram o gene *cry3A* para *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*, e observaram que apesar de não haver diferença quanto a mortalidade de *Sitonia lepidus*, a porcentagem de nódulos danificados nas plantas de trevo branco inoculadas com o transconjugante foi menor (43%) quando comparada com as plantas inoculadas com a estirpe padrão (73%). Posteriormente estes autores, visando aumentar a eficiência do controle, utilizaram novas construções do gene *cry3A*, que consistiam na sua clonagem sob o controle de promotores associados a fixação biológica de nitrogênio (*pnifHDK*) ou a rizosfera (*prhiABC*). Plantas de trevo branco ou ervilha contendo rizóbios transgênicos, com ambas as construções, não causaram mortalidade de *S. flavescens*, apesar de ter havido redução nos danos causados por esta praga, e a produção de δ -endotoxina ocorreu em doses sub-letais, variando de 25 a 250 ng de proteína por nódulo (SKOT *et al.*, 1994).

BEZDICEK *et al.* (1994), visando o controle de *S. lineatus* e *S. hispidulus* em ervilha e alfafa, transferiram o gene *cry3A* sob o controle dos promotores *pnifH* e *placZ*, para *Rhizobium leguminosarum* biovar *viceae* e *R. meliloti*, respectivamente. Houve redução na

porcentagem de nódulos danificados nas duas espécies de plantas e com ambos os promotores, porém não foi detectada mortalidade imediata dos insetos.

Para controlar *Rivellia angulata* em plantas de guando, NAMBIAR *et al.* (1990) utilizaram transconjugantes de *Bradyrhizobium* sp expressando o gene *cry4* sob o controle do promotor do cluster nodABCIX. Bioensaios realizados em solo não estéril mostraram uma redução nos nódulos danificados de 79% (controle) para 46% (transconjugante). Quarenta dias após a exposição das plantas as larvas, somente aquelas inoculadas com a bactéria transgênica possuíam folhas verdes.

Enfocando ainda o uso de bactérias diazotróficas transgênicas, UDAYASURIYAN *et al.* (1995) transferiram o gene *cryIAa* para *Azospirillum lipoferum* e *A. brasilense*. Entretanto, não foram obtidos transconjugantes desta última espécie. Apesar de confirmada a presença do plasmídeo contendo o gene *cry* nos transconjugantes de *A. lipoferum*, não foi detectada a expressão deste gene. Estudos avaliando a estabilidade do plasmídeo e o crescimento do transconjugante revelaram que a manutenção do gene *cry* inibia o crescimento de *A. lipoferum*, talvez devido ao conteúdo de bases G+C no genoma desta bactéria ser muito elevado (variando de 67 a 71%) com relação ao gene *cryIAa* (37%).

Ainda dentro da linha de bactérias diazotróficas transgênicas, a utilização de *Acetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae* e *H. rubrisubalbicans*, contendo o genes *cry*, como agentes de controle biológico, representam uma alternativa interessante (SALLES, 1998). Estas espécies possuem características que favorecem o seu uso como vetores, como a capacidade de colonizar endofiticamente os tecidos de plantas, permitindo o controle de pragas que se alimentam dos tecidos internos; a baixa taxa de sobrevivência no solo, que dificulta a transferência dos genes introduzidos para outros microrganismos; e a faixa restrita de hospedeiro (algumas gramíneas e no caso de *A. diazotrophicus*, também batata doce) (BALDANI *et al.*, 1997).

Outros microrganismos também foram modificados geneticamente para serem capazes de expressar o gene da δ -endotoxina. Visando aumentar a velocidade de ação de baculovírus, MARTENS *et al.* (1990) substituíram o gene da poliedrina do vírus de poliedrose nuclear *Autographa californica* (AcNPV) pelo gene *cryIAb* de *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* 7.21. Células de *Spodoptera frugiperda* infectadas com o recombinante de

AcNPV produziram a δ -endotoxina em altos níveis (5%) e quando aplicadas sobre folhas de repolho, causaram 97% de mortalidade a *Pieris brassicae*, um inseto altamente sensível a proteína Cry1Ab porém não suscetível a AcNPV. Apesar de ser impossível a utilização deste recombinante no campo, em função da sua rápida inativação devido a ausência de poliedro, o fato dos cristais de *B. thuringiensis* produzidos em células infectadas por AcNPV serem biologicamente ativos, torna possível a utilização desta estratégia no aumento da patogenicidade de baculovírus. A utilização de recombinantes contendo o gene *cry* inserido no locus do gene p10 de baculovírus vem sendo estudada por estes autores.

B. thuringiensis subsp. *israelensis* vem sendo usado amplamente no controle de mosquitos, entretanto o seu uso é limitado pela baixa persistência das preparações em condições de campo. Uma alternativa para contornar esta limitação é a introdução do gene da δ -endotoxina em organismos que servem de alimento para as larvas de mosquitos, como as cianobactérias (MURPHY & STEVENS, 1992). XIAOQIANG *et al.* (1997) introduziram os genes *cry4A*, *cry11A* e *p20* na espécie de cianobactéria *Anabaena* sp. estirpe PCC 7120. Estes autores observaram elevada toxicidade de dois clones, um contendo o gene *p20* e outro não, contra larvas de 3º instar de *Aedes aegypti*.

6. Considerações finais

O desenvolvimento de uma agricultura sustentável é uma preocupação mundial, que tem levado a busca de alternativas menos prejudiciais ao meio ambiente, como a substituição dos pesticidas químicos por agentes de controle biológico. Os métodos biológicos ainda são pouco empregados, representando somente 1% do total utilizado no controle de insetos. Deste total, 98% corresponde ao uso de *B. thuringiensis*. Isso se deve à faixa restrita de hospedeiro, à rápida ação dos cristais protéicos contra a praga alvo e à facilidade de obtenção destes cristais, tornando economicamente viável a sua utilização.

Apesar do extenso uso de *B. thuringiensis*, algumas características ainda limitam a sua aplicação, como rápida degradação dos cristais quando expostos a luz ultra-violeta e a incapacidade de controlar pragas que se alojam no interior das plantas. Para minimizar

estas características, foram desenvolvidos produtos biotecnológicos a partir da introdução de genes *cry* em plantas e microrganismos. Cada organismo transgênico possui algumas características favoráveis e outras desfavoráveis, que devem ser avaliadas com cautela antes da sua liberação, para que não ocorra nenhum tipo de dano ao ambiente.

Para que haja um aumento na utilização de *B. thuringiensis* como agente de controle

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, L.F.; BROWN, K.L.; WHITELEY, H.R. Molecular cloning and characterisation of two genes encoding sigma factors that direct transcription from a *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene promoter. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.171, p.3846-3854, 1991.
- ADAMS, L.F.; VISICK, J.E.; WHITELEY, H.R. A 20-kilodalton protein is required for efficient production of the *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* 27-kilodalton crystal protein in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.171, p.521-530, 1989.
- ADANG, M.J.; BRODY, M.S.; CARDINEAU, G.; EAGAN, N.; ROUSH, R.T.; SHEWMAKER, C.K.; JONES, A.; OAKES, J.V.; McBRIDE, K.E. The reconstruction and expression of a *Bacillus thuringiensis cryIIIa* gene in protoplasts and potato plants. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.21, p.1131-1145, 1993.
- AGAISSE, H.; LERECLUS, D. How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein? **Journal of Bacteriology**, Washington, v.177, p.6027-6032, 1995.
- BALDANI, J.I.; CARUSO, L.; BALDANI, V.L.D.; GOI, S.R.; DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.29, p.911-922, 1997.
- BARTON, K.A.; WHITELEY, H.R.; YANG, N.-S. *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin expressed in transgenic *Nicotiana tabacum* provides resistance to lepidopteran insects. **Plant Physiology**, Beltsville, v.85, p.1103-1109, 1987.
- BEZDICEK, D.F.; QUINN, M.A.; FORSF, L.; HERON, D.; KAHN, M.L. Insecticidal Activity and Competitiveness of *Rhizobium* spp Containing the *Bacillus thuringiensis* subsp *tenebrionis* δ -endotoxin Gene (cryIII) in Legume Nodules. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.26, p.1637-1646, 1994.

- BIETLOT, H.P.L.; VISHNUBHATLA, I.; CAREY, P.R.; POZSGAY, M.; KAPLAN, H. Characterization of the cysteine residues and disulphide linkages in the protein crystal of *Bacillus thuringiensis*. **Biochemical Journal**, London, v.267, p.309-315, 1990.
- BOSH, D.; SCHIPPER, B.; VAN DER KLEIJ, H.; MAAGD, R.A.; STIEKEMA, W.J. Recombinant *Bacillus thuringiensis* crystal proteins with new properties: possibilities for resistance management. **Bio/Technology**, New York, v.12, p.915-918, 1994.
- BROWN, K.L. Transcriptional regulation of the *Bacillus thuringiensis* subsp. *thompsoni* crystal protein gene operon. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.175, p.7951-7957, 1993.
- BROWN, K.L.; WHITELEY, H.R. Isolation of the second *Bacillus thuringiensis* RNA polymerase that transcribes from a crystal protein gene promoter. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.172, p.6682-6688, 1990.
- CAROZZI, N.B.; KOZIEL, M.G. Transgenic maize expressing a *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein for control of European corn borer. In: CAROZZI, N.; KOZIEL, M., ed. **Advances in insect control: the role of transgenic plants**. London: Taylor & Francis, 1997. p.63-74.
- CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D.R.; FEITELSON, J.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; DEAN, D. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v.62, p.807-813, 1998.
- DERVYN, E.; PONCET, S.; KLIER, A.; RAPOPORT, G. Transcriptional regulation of the *cryIVD* gene operon from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.177, p.2283-2291, 1995.
- DE SOUZA, M.T.; LECADET, M.M.; LERECLUS, D. Full expression of the *cryIIIa* toxin gene of *Bacillus thuringiensis* requires a distant upstream DNA sequence affecting transcription. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.175, p.2952-2960, 1993.
- DE SOUZA, M.T.; LECADET, M.M.; LERECLUS, D. High level transcription of the *cryIIIa* toxin gene of *Bacillus thuringiensis* depends on a second promoter located

- 600 bp upstream of the translational start site. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v.19, p.197-203, 1996.
- DUCK, N.; EVOLA, S. Use of transgenes to increase host plant resistance to insects: opportunities and challenges. In: CAROZZI, N.; KOZIEL, M., ed. **Advances in insect control: the role of transgenic plants**. London: Taylor & Francis, 1997. p.1-20.
- ELY, S. Engineering of plants to express δ -endotoxins. In: ENTWISTLE, P.F.; CORY, J.S.; BAILEY, M.J.; HIGGS, S., ed. *Bacillus thuringiensis*, **an environmental biopesticide: theory and practice**. Chichester: John Wiley, 1993. p.105-124.
- FELDMAN, J.; STONE, T. The development of a comprehensive resistance management plan for potatoes expressing the Cry3A endotoxin. In: CAROZZI, N.; KOZIEL, M., ed. **Advances in insect control: the role of transgenic plants**. London: Taylor & Francis, 1997. p.49-61.
- FUJIMOTO, H.; ITOH, K.; YAMAMOTO, M.; KYOZUKA, J.; SHIMAMOTO, K. Insect resistant rice generated by introduction of a modified δ -endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis*. **Bio/Technology**, New York, v.11, p.1151-1155, 1993.
- GARCZYNSKI, S.F.; ADANG, M.J. *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) δ -endotoxin binding aminopeptidase in *Manduca sexta* midgut has a glycosyl-phosphatidylinositol anchor. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Elmsford, v.25, p.409-415, 1995.
- GARCZYNSKI, S.F.; CRIM, J.W.; ADANG, M.J. Identification of putative insect brush border membrane-binding molecules specific to *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin by protein blot analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.57, p.2816-2820, 1991.
- GAZIT, E.; SHAI, Y. The assembly and organisation of the $\alpha 5$ and $\alpha 7$ helices from the pore-forming domain of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.270, p.2571-2578, 1995.
- GELERNTER, W.; SCHWAB, G.E. Transgenic bacteria, viruses, algae and other microorganisms as *Bacillus thuringiensis* toxin delivery systems. In: ENTWISTLE, P.F.; CORY, J.S.; BAILEY, M.J.; HIGGS, S., ed. *Bacillus thuringiensis*, **an**

- environmental biopesticide:** theory and practice. Chichester: John Wiley, 1993. p.89-104.
- GILL, S.S.; COWLES, E.A.; PITRANTONIO, P.V. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v.37, p.615-636, 1992.
- GLATRON, M.F.; RAPOPORT, G. Biosynthesis of the parasporal inclusion of *Bacillus thuringiensis*: half-life of its corresponding messenger RNA. **Comptes Rendus Academie Sciences Paris**, Paris, v.269, p.1338, 1341, 1972.
- GLEAVE, A.P.; WILLIAMS, R.; HEDGES, R.J. Screening by Polymerase Chain Reaction of *Bacillus thuringiensis* serotypes for the presence of *cryV*-like insecticidal protein genes and characterisation of a *cryV* gene cloned from *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.59, p.1683-1687, 1993.
- GROCHULSKI, P.; MASSON, L.; BORISOVA, S.; PUSZTAI-CAREY, M.; SCHWARTZ, J.-L.; BROUSSEAU, R.; CYGLER, M. *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. **Journal of Molecular Biology**, London, v.254, p.447-464, 1995.
- HERRERA, G.; SNYMAN, S.J.; THOMSON, J.A. Construction of a bioinsecticidal strain of *Pseudomonas fluorescens* active against the sugarcane borer, *Eldana saccharina*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.60, p.682-690, 1994.
- HÖFTE, H.; WHITELEY, H.R. Insecticidal Crystal Proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiological Reviews**, Washington, v.53, p.242-255, 1989.
- HUSSAIN, S.R.A.; ARONSON, A.I.; DEAN, D.H. Substitution of residues on the proximal side of Cry1A *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin affects irreversible binding to *Manduca sexta* midgut membrane. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v.226, p.8-14, 1996.
- KNOWLES, B.H. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal δ -endotoxins. **Advances in Insect Physiology**, San Diego, v.24, p.275-308, 1994.

- KNOWLES, B.H.; DOW, J.A.T. The Crystal δ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis*: Models for their mechanism of action on the insect gut. **BioEssays**, Cambridge, v.15, p.469-476, 1993.
- KNOWLES, B.H.; ELLAR, D.J. Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins with different insect specificity. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.924, p.509-518, 1987.
- KOZIEL, M.G.; BELAND, G.L.; BOWMAN, C.; CAROZZI, N.B.; CRENSHAW, R.; CROSSLAND, L.; DAWSON, J.; DESAI, N.; HILL, M.; KADWELL, S.; LAUNIS, K.; LEWIS, K.; MADDOX, D.; McPHERSON, K.; MEGHJI, M.R.; MERLIN, E.; RHODES, R.; WARREN, G.W.; WRIGHT, M.; EVOLA, S. Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. **Bio/Technology**, New York, v.11, p.194-200, 1993.
- LAMBERT, B.; HÖFTE, H.; ANNYS, K.; JANSENS, S.; SOETART, P.; PEFEROEN, M. Novel *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein with a silent activity against coleopteran larvae. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.58, p.2536-2542, 1992.
- LAMPEL, J.S.; CANTER, G.L.; DIMOCK, M.B.; KELLY, J.L.; ANDERSON, J.J.; URATANI, B.B.; FOULKE JR, J.S.; TURNER, J.T. Integrative cloning, expression, and stability of the *cryIA(c)* gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in a recombinant strain of *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.60, p.501-508, 1994.
- LERECLUS, D.; AGAISSE, H.; GOMINET, M.; CHAUF AUX, J. Overproduction of encapsulated insecticidal crystal proteins in a *Bacillus thuringiensis* *spo0A* mutant. **Bio/Technology**, New York, v.13, p.67-71, 1995.
- LERECLUS, D.; DELÉCLUSE, A.; LECAD ET, M.-M. Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. In: ENTWISTLE, P.F.; CORY, J.S.; BAILEY, M.J.; HIGGS, S., ed. *Bacillus thuringiensis, an environmental biopesticide: theory and practice*. Chichester: John Wiley, 1993. p.37-69.
- LERECLUS, D.; BOURGOUIN, C.; LECAD ET, M.M.; KLIER, A.; RAPOPRT, G. Role, structure, and molecular organisation of the genes coding for the parasporal δ -

- endotoxins of *Bacillus thuringiensis*. In: SMITH, I.; SLEPECKY, R.A.; SETLOW, P., ed. **Regulation of prokaryotic development**. Washington: American Society of Microbiology, 1989. p.255-276.
- LI, J. Insecticidal δ -endotoxins from *Bacillus thuringiensis*. In: PARKER, M.W., ed. **Protein Toxin Structure**. R.G. Landes, 1996. p.49-77.
- LI, J., CARROLL, J., ELLAR, D.J. Crystal structure of insecticidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5Å resolution. **Nature**, London, v.353, p.815-821, 1991.
- MARTENS, J.W.M.; HONÉE, G.; ZUIDEMA, D.; van LENT, J.W.M.; VISSER, B.; VLAK, J.M. Insecticidal activity of a bacterial crystal protein expressed by a recombinant Baculovirus in insect cells. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.56, p.2764-2770, 1990.
- McBRIDE, K.E.; SVAB, Z.; SCHAAF, D.J.; HOGAN, P.S.; STALKER, D.M.; MALIGA, P. Amplification of a chimeric *Bacillus* gene in chloroplasts leads to an extraordinary level of an insecticidal protein in tobacco. **Bio/Technology**, New York, v.13, p.362-365, 1995.
- McPHERSON, S.A.; PERLAK, F.J.; FUCHS, R.L.; MARRONE, P.G.; LAVRIK, P.B.; FISCHHOFF, D.A. Characterisation of the coleopteran-specific protein gene of *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. **Bio/Technology**, New York, v.6, p.61-66, 1988.
- MURPHY, R.C.; STEVENS JR., E. Cloning and expression of the *cryIVD* gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in the cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum* PR-6 and its resulting larvicidal activity. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.58, p.1650-1655, 1992.
- MURRAY, E.E.; ROCHELEAU, T.; EBERLE, M. STOCK, C.; SEKAR, V.; ADANG, M. Analysis of unstable RNA transcripts of insecticidal crystal protein genes of *Bacillus thuringiensis* in transgenic plants and electroporated protoplasts. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.16, p.1035-1050, 1991.
- NAMBIAR, P.T.C.; MA, S-W.; IYER, V.N. Limiting an insect infestation of nitrogen-fixing root nodules of pigeon pea (*Cajanus cajan*) by engineering the expression of

- an entomocidal gene in its root nodules. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.56, p.2866-2869, 1990.
- OBUKOWICZ, M.G.; PERLAK, F.J.; KUSANO-KRETZMER, K.; MAYER, E.J.; WATRUP, L.S. Integration of the delta-endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* into the chromosome of root-colonising strains of *Pseudomonas* using Tn5. **Gene**, Amsterdam, v.45, p.327-331, 1986.
- PEFEROEN, M. Insect control with transgenic plants expressing Bt crystal proteins. In: CAROZZI, N.; KOZIEL, M., ed. **Advances in insect control: the role of transgenic plants**. London: Taylor & Francis, 1997. p.21-48.
- PERLAK, F.; STONE, T.B.; MUSKOPF, Y.M.; PETERSEN, L.J.; PARKER, G.B.; McPHERSON, S.A.; WYMAN, J.; LOVE, S.; BIEVER, D.; REED, G.; FISCHHOFF, D. Genetically improved potatoes: protection from damage by Colorado potato beetles. **Plant Molecular Biology**, v.22, p.313-321, 1993.
- SANCHIS, V.; CHAOFAUX, J.; PAURON, D. A comparison and analysis of the toxicity and receptor binding properties of *Bacillus thuringiensis* CryIC δ -endotoxin on *Spodoptera littoralis* and *Bombyx mori*. **FEBS Letters**, Amsterdam, v.353, p.259-263, 1994.
- SALLES, J.F. Uso da *Acetobacter diazotrophicus* como vetor para expressão do gene *cry3A* de *Bacillus thuringiensis*, visando o controle de coleópteros na lavoura canavieira. Rio de Janeiro: UFRRJ, 1998. 64p. Tese de mestrado.
- SCHNEPF, E.; CRICKMORE, VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; N.; ZEIGLER, D.R.; DEAN, D. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v.62, p.775-806, 1998.
- SCHNEPF, H.E. *Bacillus thuringiensis* toxins: regulation, activities and structural diversity. **Current Opinion in Biotechnology**, Philadelphia, v.6, p.305-312, 1995.
- SCHWARTZ, J.L.; POTVIN, L.; CHEN, X.J.; BROUSSEAU, R.; LAPRADE, R.; DEAN, D.H. Sigle site mutations in the conserved alternating-arginine region affect ionic channels formed by CryIAa, a *Bacillus thuringiensis* toxin. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.63, p.3978-3984, 1997.

- SKØT, L.; HARRISON, S.P.; NATH, A.; MYTTON, L.R.; CLIFFORD, B.C. Expression of insecticidal activity in *Rhizobium* containing the δ -endotoxin gene cloned from *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis*. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.127, p.285-295, 1990.
- SKØT, L.; TIMMS, E.; MYTTON, L.R. The Effect of Toxin Producing *Rhizobium* Strains, on Larvae of *Sitonia flavescens* Feeding on Legume Roots and Nodules. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.163, p.141-150, 1994.
- TAILOR, R.; TIPPET, J.; GIBB, G.; PELLIS, S.; PIKE, D.; JORDAN, L.; ELY, S. Identification and characterisation of a novel *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin gene entomocidal to coleopteran and lepidopteran larvae. **Molecular Microbiology**, Oxford, v.6, p.1211-1217, 1992.
- UDAYASURIYAN, V.; NAKAMURA, A.; MASAKI, H.; UOZUMI, T. Transfer of an Insecticidal Protein Gene of *Bacillus thuringiensis* into Plant-colonising *Azospirillum*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v.11, p.163-167, 1995.
- VAEK, M.; REYNAERTS, A.; HÖFTE, H.; JANSENS, S.; De BEUCKELEER, M.; DEAN, C.; ZABEAU, M.; VON MONTAGU, M.; LEEMANS, J. Transgenic plants protected from insect attack. **Nature**, London, v.328, p.33-37, 1987.
- VALAITIS, A.P.; LEE, M.K.; RAJAMOHAN, F.; DEAN, D.H. Brush border membrane aminopeptidase-N in the midgut of the gypsy moth serves as the receptor for the CryIA(c) δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Elmsford, v.25, p.1143-1151, 1995.
- VAN AARSEN, R.; SOETAERT, P.; STAM, M.; DOCKX, J.; GOSSELE, V.; SEURINCK, J.; REYNAERTS, A.; CORNELISSEN, M. cryIA(b) transcript formation in tobacco is inefficient. **Plant and Molecular Biology**, Dordrecht, v.28, p.513-524, 1995.
- VAN FRANKENHUYSEN, K. The challenge of *Bacillus thuringiensis*. In: ENTWISTLE, P.F.; CORY, J.S.; BAILEY, M.J.; HIGGS, S., ed. *Bacillus thuringiensis, an environmental biopesticide: theory and practice*. Chichester: John Wiley, 1993. p.1-36.

- VAN RIE, J.; McGAUGHEY, W.H.; JOHNSON, D.E.; BARNETT, B.D.; VAN MELLAERT, H. Mechanism of insect resistance to the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. **Science**, Baltimore, v.247, p.72-74, 1990.
- WONG, H.C.; CHANG, S. Identification of a positive retroregulator that stabilises mRNAs in bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v.83, p.3233-3237, 1986.
- WÜNN, J.; KLÖTI, A.; BURKHARDT, P.K.; GHOSH BISWAS, G.C.; LAUNIS, K.; IGLESIAS, V.A.; POTRYKUS, I. Transgenic indica rice breeding line IR58 expressing a synthetic *cryIA(b)* gene from *Bacillus thuringiensis* provides effective insect pest control. **Bio/Technology**, New York, v.14, p.171-176, 1996.
- XIAOQIANG, W.; VENNISON, J.; HUIRONG, L.; BEN-DOV, E.; ZARITSKY, A.; BOUSSIBA, S. Mosquito larvicidal activity of transgenic *Anabaena* strain PCC 7120 expressing combinations of genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.63, p.4971-4975, 1997.