

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS
Centro de Biotecnologia – Cbiot
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e
Molecular – PPGBCM**

**TOXINAS Cry: PERSPECTIVAS PARA OBTENÇÃO DE
ALGODÃO TRANSGÊNICO BRASILEIRO.**

Mariana Torquato Quezado de Magalhães
Porto Alegre, 11 de abril de 2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS
Centro de Biotecnologia – Cbiot
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e
Molecular – PPGBCM

TOXINAS Cry: PERSPECTIVAS PARA OBTENÇÃO DE
ALGODÃO TRANSGÊNICO BRASILEIRO.

Mariana Torquato Quezado de Magalhães 1135/04-0

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências.

ORIENTADORA
Dra. Maria Fátima Grossi de Sá

CO-ORIENTADORA
Dra. Célia Regina R. S. Carlini

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS
Centro de Biotecnologia – Cbiot
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e
Molecular – PPGBCM

Mariana Torquato Quezado de Magalhães 1135/04-0

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado pela Banca Examinadora:

Dra. Maria Helena Zanettini

Dra. Lídia Mariana Fiuza

Dr. Henrique Ferreira

Porto Alegre, 11 de abril de 2006

Este trabalho foi desenvolvido, em sua totalidade, no Laboratório de Interação Molecular Planta-Praga da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF. Teve o apoio dos laboratórios de Tecnologia de Alimentos no Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA), Porto Alegre, RS, e do Laboratório de Proteínas Tóxicas no Instituto de Biociências, Porto Alegre, RS, localizados na Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os auxílios financeiros foram provenientes da Fundação de Apoio à Cultura do Algodão (FACUAL), Programa de Apoio aos Núcleos de Excelência (MCT/PRONEX) e Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Ao meu amado pai, **Sylvio Quezado**, exemplo de vida. Seu apoio, acompanhamento diário e auxílio permitiram o meu crescimento acadêmico. Não somente isso, mas a construção de uma vida que busca o caminho da verdade.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À **EMBRAPA**, pela oportunidade de realizar este projeto em sua estrutura física e compartilhando a vivência com seus pesquisadores.

À **Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS**

Ao **Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM)** do Centro de Biotecnologia da UFRGS

À **Universidade de Brasília – UnB**

Às fontes financiadoras **EMBRAPA, CAPES, FACUAL** e **CNPq**, pelo apoio financeiro

AGRADECIMENTOS PESSOAIS

Ao **Dr. João A. N. Batista**, excelente orientador e profissional exemplar. Por toda sua amizade, apoio e ensinamentos ao longo de todos estes anos. Agradeço por todos os momentos.

Ao meu querido amigo **Rodrigo da Rocha Fragoso**, pela eterna amizade, confiança e sabedoria, sem os quais eu não saberia viver.

À **Isabela** pela amizade e ajuda em todos os momentos (principalmente os mais conturbados).

À amiga de todas as horas, **Marília Santos Silva**, doutora no papel, no coração e na alma. Obrigada por todas as palavras de sabedoria e pela oportunidade de discutir ciência.

Ao **Dr. Osmundo Brilhante**, colega de trabalho e amigo. Obrigada pela paciência e total participação no meu processo de aprendizagem.

Ao **Dr. Thales** pela paciência e ajuda nos momentos de desespero. E, por me guiar nos primeiros passos proteômicos.

À **Dra. Simoni Dias** pelo maior ensinamento da minha vida: A vida é curta demais para pequenas competições. E, imensamente obrigada, por me ajudar e colaborar em todos os momentos que precisei. Obrigada pelo tempo despendido com os bioensaios e produção de proteínas.

Às **amigas Rai e Lizi** pelas milhares de noites, madrugadas e manhãs mal dormidas. Sem vocês seria muito monótono!

À **Fernanda Mulinari** (agora Fontana, também) por questões imensuráveis. A você o meu mais sincero obrigado.

Ao **Herbert**, pelas correções no artigo e pelos dias de natal, dentro do laboratório tentando extrair intestinos de insetos.

Aos verdadeiros amigos do Laboratório de Interação Molecular Planta-Praga (LIMPP): **Rachels, Antonio Américo, Paulinha, Patrícia Brunetta e Norma Paes.**

À **Lú e o Hudson**, pela bela oportunidade de orientar e aprender sempre.

Aos demais **colegas do LIMPP** pela companhia.

Aos colegas de trabalho do Laboratório de Espectrometria de massa (LEM), em especial, **Guil, Zé Roberto, Karlinha, Marta, Daniel Sifu, Flávio, Luciano, Saulo, Vladimir, Lindomar, Maura e Jorge.**

Ao amigo **LH Soares** pela receptividade, ajuda e amizade nos momentos que precisei em Porto Alegre.

Ao **Prof. Dr. MAZ Ayub** pela receptividade em seu laboratório e pela oportunidade de aprender.

Aos componentes do **Laboratório de Biotecnologia do ICTA/ UFRGS**

Aos colegas do **Laboratório de Proteínas Tóxicas** pela receptividade e ajuda.

Ao **Tinoko** por me aturar em Porto Alegre. Obrigadinha!

À **Sílvia e ao Luciano**, da secretaria do PPGBCM, pela imensa paciência, carinho, ajuda, atenção e competência.

À **Profa. Márcia Margis** pela revisão da dissertação

À **Profa. Dra. Célia Carlini**, pela credibilidade e confiança sem os quais os primeiros passos desta jornada não seriam dados. Obrigada pelos conselhos que me guiarão até o futuro.

Ao **Dr. Carlos Bloch**, pelo presente e o futuro. Mas principalmente pela receptividade em seu grupo de pesquisa.

À **Dra. Maria Fátima Grossi de Sá**, minha orientadora, por todos os seus ensinamentos e, principalmente, por sempre acreditar no meu trabalho. À Fátima eu rendo os meus mais sinceros agradecimentos.

“Observando a vida na Terra, é fácil pensar, que somos supremos. O poder da consciência e da sociedade e das invenções técnicas nos faz acreditar que somos a mais avançada forma de vida no planeta. Nem mesmo a grande escuridão do espaço nos torna mais humildes. Consideramos o espaço como uma terra de ninguém que deve ser penetrada e conquistada, da mesma forma que achamos que fizemos a Terra... Essa percepção nos mostra claramente a arrogância e a presunção de tentar medir a evolução por meio de uma progressão linear.”

Lynn Margulis, em Microcosmos

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	xviii
ÍNDICE DE TABELAS	xiv
ABREVIATURAS	xv
RESUMO	xvii
ABSTRACT	xviii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Breve histórico do algodão	1
1.2 O cultivo do algodão no Brasil	2
1.3 As pragas do algodoeiro	3
1.3.1. Bicudo-do-Algodoeiro (<i>Anthonomus grandis</i>)	4
1.3.2. Lagarta do cartucho (<i>Spodoptera frugiperda</i>)	6
1.4 Geração de tecnologia para controle de pragas	7
1.5 <i>Bacillus thuringiensis</i>	8
1.5.1. δ -endotoxinas	10
1.5.2. Estrutura tridimensional das proteínas Cry	12
1.5.3. Mecanismo de ação das proteínas Cry	12
1.5.4. Localização dos genes <i>cry</i>	14
1.6. Desenvolvimento de plantas transgênicas: Importâncias e Perspectivas	15
2. JUSTIFICATIVA	16
3. HIPÓTESE	16
4. OBJETIVOS	16
4.1 Objetivos Gerais	16
4.2 Objetivos Específicos e Estratégias	17
4.2.1 Identificação e caracterização de estirpes de <i>B. thuringiensis</i> ativas contra os insetos-praga do algodoeiro;	17
4.2.2 Identificação de genes <i>cry</i> e produtos os quais possam estar envolvidos com a toxicidade das estirpes;	17
4.2.3 Clonagem dos genes que apresentaram potencial para o controle das pragas em questão;	17

4.2.4	Expressão dos genes em sistema heterólogo com <i>Escherichia coli</i> ,	18
4.2.5	Determinação da atividade biológica em bioensaios com larvas de insetos de <i>A. grandis</i> e <i>S. frugiperda</i> .	18
5.	MATERIAL E MÉTODOS	19
5.1	Caracterização protéica da estirpe S811	19
5.1.1	Condições de cultivo	19
5.1.2	Preparação de misturas esporos-cristais ou extração de proteína total	19
5.1.3	Análise das proteínas em gel de poliacrilamida (SDS – PAGE)	20
5.1.4	Purificação de cristais	20
5.1.5	Caracterização morfológica dos cristais	21
5.2	Identificação de genes <i>cry</i> na estirpe S811	21
5.2.1	Extração de DNA de <i>B. thuringiensis</i> (Método CTAB)	21
5.2.2	Amplificação de DNA por PCR	22
5.2.3	Clonagem dos produtos de PCR e transformação de clones	23
5.2.4	Extração de DNA plasmidial	24
5.2.5	Seqüenciamento de DNA e análise computacional das seqüências	25
5.3	Clonagem do novo gene <i>cry8</i>	26
5.4	Clonagem do gene <i>cry1I</i>	28
5.5	Obtenção das toxinas recombinantes <i>Cry1Ia12</i> e <i>Cry8Ha1</i>	28
5.5.1.	Construção dos vetores de expressão <i>pET101/cry1Ia12</i> e <i>pET101/cry8Ha1</i>	28
5.5.2.	Expressão dos genes <i>cry1Ia12</i> e <i>cry8Ha1</i> em <i>Escherichia coli</i>	32
5.5.3.	Purificação das toxinas recombinantes <i>Cry1Ia12</i> e <i>Cry8Ha1</i> recombinantes	33
5.6	Bioensaios	33
5.6.1.	Bioensaios com larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i>	33
5.6.2.	Bioensaios com larvas de <i>Anthonomus grandis</i>	34
6.	RESULTADOS	35
6.1.	Caracterização da estirpe S811	35
6.1.1	Bioensaios preliminares	35
6.1.2	Caracterização bioquímica da estirpe S811	35
6.1.3.	Caracterização estrutural dos cristais	38
6.2.	Identificação de genes <i>cry</i> e seqüenciamento parcial dos genes	40
6.2.1	Gene <i>cry1A</i>	40
6.2.2	Gene <i>cry1I</i>	43
6.2.3	Gene <i>cry8</i>	46
6.3.	Isolamento e clonagem do novo gene <i>cry8</i>	48
6.4.	Isolamento e clonagem do gene <i>cry1I</i>	53

6.5. Obtenção das toxinas recombinantes Cry1Ia12 e Cry8Ha1	58
6.5.1 Amplificação dos genes <i>cry1Ia12</i> e <i>cry8Ha1</i> e construção dos vetores de expressão.	58
6.5.2 Expressão heteróloga da toxina Cry1Ia12.	59
6.5.3 Expressão heteróloga da toxina Cry8Ha1.	61
6.5.4. Purificação das toxinas recombinantes	62
6.6. BIOENSAIOS	63
7. DISCUSSÃO	65
8. PERSPECTIVAS	72
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
<i>Curriculum vitae</i>	81

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Alinhamento da estrutura protéica primária das toxinas Cry.	11
Figura 2: TAIL-PCR. Representação esquemática da técnica de TAIL-PCR.	27
Figura 3: Mapa do vetor comercial pET101/D-TOPO.	30
Figura 4: Esquema do sistema de ligação do produto de PCR no vetor de pET101/D-TOPO.	31
Figura 5: Análise perfil protéico da estirpe de <i>Bacillus thuringiensis</i> S811.	37
Figura 6: Microscopias eletrônica de varredura, confocal e contraste de fase.	39
Figura 7: Amplificação do gene <i>cry1Ab</i> .	41
Figura 8: Alinhamento múltiplo de seqüências do banco de dados com o fragmento gênico clonado <i>cry1Ab</i> utilizando ClustalW 2.0.	42
Figura 9: Primeira amplificação do gene <i>cry1I</i> .	44
Figura 10: Alinhamento múltiplo de seqüências do banco de dados com o fragmento gênico clonado <i>cry1I</i> utilizando ClustalW 2.0.	45
Figura 11: Amplificação do gene <i>cry8</i> .	47
Figura 12: Clonagem do gene <i>cry8</i> da estirpe S811 por TAIL-PCR.	50
Figura 13: Representação esquemática do consenso do gene <i>cry8Ha1</i> .	51
Figura 14: Dendrograma do alinhamento da nova toxina Cry8Ha1.	52
Figura 15: Amplificação do gene <i>cry1I</i> .	54
Figura 16: Seqüência completa do gene <i>cry1Ia12</i> .	55
Figura 17: Dendrograma do alinhamento da toxina Cry1Ia12.	56
Figura 18: Dendrograma do alinhamento das toxinas Cry1Ia12 e Cry8Ha1 com outras presentes no banco de dados.	57
Figura 19: Análise por SDS-PAGE 12% da expressão do gene <i>cry1Ia12</i>	60
Figura 20: Análise por SDS-PAGE 12% da expressão do gene <i>cry8Ha1</i>	61
Figura 21: Análise por SDS-PAGE 12% da proteína recombinante Cry1Ia12 purificada por cromatografia de afinidade (Ni-NTA).	62
Figura 22: Análise por SDS-PAGE 12% da proteína recombinante Cry8Ha1 purificada por cromatografia de afinidade (Ni-NTA).	63
Figura 23: Bioensaios contra <i>A. grandis</i> e <i>S. frugiperda</i> com as toxinas Cry1Ia12 e Cry8Ha1.	64

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Descrição dos oligonucleotídeos utilizados nas ampliações por PCR.	23
Tabela 2. Sorotipo e toxicidade de estirpes de <i>B. thuringiensis</i> contra larvas de <i>S. frugiperda</i> , <i>A. gemmatalis</i> e <i>A. grandis</i> . (Silva, S., 2002).	35

ABREVIATURAS

Aa	Aminoácidos
Amp	Ampicilina - antibiótico
ATG	Códon de iniciação da transcrição: adenina, timina, guanina.
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
C-terminal	Região carboxi terminal de uma proteína
Cl ₅₀	Concentração letal a qual mata 50% de indivíduos testados
cm ²	Centímetros quadrados
<i>cry</i>	Corresponde aos genes Bt
Cry	Corresponde as proteínas Bt
CTAB	Hexadecyl trimethyl ammonium bromide
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTPs	Deoxi-ribonucleotídeos trifosfato
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetra-acético
g	Gramas
<i>g</i>	Unidade de força centrífuga
GCG	Genetics Computer Group
h	horas
His	Histidina
IPTG	Isopropil-beta-D-thiogalactopiranosídeo
Kb	Quilobase – 10 ³ pares de bases
KDa	Quilo daltons (1.000 Daltons).
L	Litros
LB	Meio de cultura Luria-Bertani
LB-amp	Meio de cultura Luria-Bertani com 100 µg/mL de ampicilina
LB-amp ₁	Meio de cultura Luria-Bertani com 200 µg/mL de ampicilina
LB-ágar	Meio de cultura Luria-Bertani sólido
LB-ágar-amp	Meio de cultura LB sólido com 100 µg/mL de ampicilina
M	Molar
µF	MicroFaraday
µg	Microgramas
µL	Microlitros

mA	Miliampere
mg	Miligramas
min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
mm	Milímetros
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogramas
NTA	Ácido nitroacético
N-terminal	Região amino-terminal de uma proteína
nM	Nanomolar
OD ₆₀₀	Densidade óptica no comprimento de onda 600 nanômetros
Oligos	Oligonucleotídeos
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da DNA Polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
PMSF	Fenil-metil-sulfonil-fluoreto
RNAse	Ribonuclease
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
TAIL-PCR	Termal assymmetric interlaced PCR
TE	Tris-EDTA
U	Unidade
V	Volts
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-galactosídeo
°C	Graus Celsius

RESUMO

Toxinas Cry provenientes de *Bacillus thuringiensis*, também denominadas de δ -endotoxinas, possuem ampla atividade inseticida e são específicas para insetos de diferentes ordens, não sendo nocivas a mamíferos, aves, anfíbios ou répteis. Devido a esta característica, seus genes vêm sendo utilizados no desenvolvimento de plantas transgênicas, visando o controle de insetos-praga de culturas de importância econômica. Dentre estas, destaca-se o algodoeiro que tem como principais pragas o bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis*) e a lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*), ambas causadoras de grandes prejuízos econômicos. Assim, este trabalho objetivou: caracterizar uma estirpe de Bt (S811) tóxica contra *S. frugiperda* e *A. grandis*, identificar e clonar os genes codificadores de toxinas Cry potenciais para o controle dessas pragas, expressar os genes em sistema heterólogo *Escherichia coli* e testar a toxicidade das toxinas contra as pragas em questão. Os resultados obtidos nas análises da estirpe por microscopia eletrônica revelaram a presença de cristais esféricos e bipiramidais, enquanto que a análise de SDS-PAGE detectou proteínas de massa molecular com cerca de 140 kDa e 80 kDa. Posteriormente, uma caracterização gênica, utilizando oligonucleotídeos específicos para genes *cry*, identificou três genes, *cry1Ab*, *cry1la* e *cry8*, sendo estes dois últimos de maior interesse. O gene *cry8*, que foi isolado pela técnica TAIL-PCR, codifica uma proteína com 58% de identidade de aminoácidos com outras toxinas Cry8, enquanto que o gene *cry1la12* (isolado com oligonucleotídeos específicos) codifica uma proteína que possui 99% de identidade com as outras proteínas do tipo Cry1la descritas na literatura. As porções tóxicas dos genes foram clonadas e expressadas em *E. coli* produzindo as proteínas recombinantes Cry8 e Cry1la12 de aproximadamente 70 kDa (cada uma). As proteínas recombinantes causaram mortalidade de 50% para larvas de *A. grandis* com 230 $\mu\text{g/ml}$ e 160 $\mu\text{g/ml}$ de Cry1la12 e Cry8, respectivamente, enquanto que para larvas de *S. frugiperda*, apenas Cry1la12 foi tóxica causando mortalidade de 50% com 5 $\mu\text{g/ml}$. Todos estes estudos contribuirão para o desenvolvimento de plantas transgênicas de algodão, bem como para a geração de novas moléculas com maior toxicidade e especificidade utilizando a evolução molecular *in vitro* (*DNA shuffling*) destes genes.

ABSTRACT

Cry toxins or δ -endotoxins, produced by *Bacillus thuringiensis*, show broad activity against several orders of insects. In addition, they are harmless to mammals, birds, amphibian, and reptiles. Because of these characteristics, several genes have been used in the development of transgenic plants to control pests in important crops. Among them, the cotton crop is very important in Brazil and it has the cotton boll weevil, *Anthonomus grandis*, and the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, as the major pests in this crop, which cause several economic damages. The objective of this work was: to characterize a Bt strain (S811), which is toxic towards *S. frugiperda* and *A. grandis*, to identify and clone the coding genes of the Cry toxins with potential to control these pests, to express the genes in *Escherichia coli* heterologous system, and to test the toxicity of the recombinant proteins towards the reported pests. Electronic microscopic analysis revealed the presence of bipyramidal and spherical crystals and SDS-PAGE analysis showed proteins with 140 kDa and 80 kDa of molecular weight mass. Further gene characterization, using specific primer sets to detect *cry* genes, identified three genes, *cry1Ab*, *cry1la* e *cry8*, although the *cry1la* e *cry8* were the genes of major interest. The *cry8* gene was isolated through TAIL-PCR techniques and encodes a protein 58% identical to other Cry8 toxins, while the protein deduced from *cry1la12* gene showed 99% identity with other Cry1la toxins previously described. The *cry1A12* and *cry8* gene toxic fragments were cloned and expressed in *E. coli*, and the 70 kDa recombinant proteins of were tested against *A. grandis* and *S. frugiperda*. Cry1la12 toxin caused 50% mortality at 230 $\mu\text{g/ml}$ and 5 $\mu\text{g/ml}$ towards both *A. grandis* and *S. frugiperda*, respectively. Cry8 toxin caused 50% mortality only against *A. grandis* at 160 $\mu\text{g/ml}$. In addition to the transgenic cotton development program, these results will permit the generation of new molecules with higher toxicity and specificity for these pests through *in vitro* molecular evolution (DNA shuffling) of these genes.

1. INTRODUÇÃO

O algodoeiro (*Gossypium* spp.) é uma das culturas anuais mais importantes do Brasil, pelo seu valor econômico e social (Richetti e Melo Filho, 2002). A realidade dos têxteis de algodão no Brasil configura na plenitude toda a gama de situações dos novos tempos de uma economia que se globaliza. Trata-se de um segmento que sofre uma intensa transição da antiga para a nova conformação, com mudanças no plano da tecnologia de produção, dos métodos gerenciais, da organização setorial e da regulação estatal. Todas estas questões movem-se em alterações rápidas, na procura de construir uma inserção competitiva sustentável para os têxteis de algodão no Brasil, da produção de algodão em caroço ao vestuário. O enfrentamento de desafios exige diagnóstico e definição de cenários consistentes, para que idéias sejam debatidas e resultem em soluções de compromisso de implementação das medidas construtoras de um futuro desejado.

1.1 Breve histórico do algodão

O algodão pertence à família das malváceas e ao gênero *Gossypium*. Considerado como a mais importante das fibras têxteis, naturais ou artificiais, e também como a planta de aproveitamento mais completo, a qual fornece os mais variados produtos de utilidade.

As primeiras referências históricas datam dos tempos mais remotos da história do homem. Documentos e escavações indicam que esta fibra tem sido usada há mais de vinte séculos, tanto no Velho como no Novo Mundo, sendo que sua origem como planta cultivada se perde na pré-história (Beltrão, 1999).

Esta magnífica planta começou a ser cultivada na Índia 3000 anos a.C., de onde se expandiu para outras regiões através do Irã e da Ásia Ocidental. Mas foi na China que sua utilização na confecção de tecidos começou. Chegou até a Grécia, levada por Alexandre, o Grande, e depois ao Egito. A Europa, até os séculos IX e XI, utilizava somente a lã como fibra têxtil, mas conhecendo a fibra do algodão através dos Árabes da península Ibérica. Na América pré-colombiana, os nativos plantavam algumas espécies para extrair a fibra, fiar e tecer. Na indústria têxtil, o algodão ganhou impulso incontrolável no século XVIII, quando Richard Arkwright

inventou a máquina de fiar, Edmond Cartwright, o tear mecânico, e Eli Whitney, o descaroçador mecânico (Freire, 1997).

No Brasil, pouco se sabe sobre a pré-história desta malvácea. Pela época de descobrimento de nosso país, os indígenas já cultivavam o algodão, convertendo-o em fios e tecidos para fabricação de redes e pequenas peças de roupas, além de o usarem em tochas incendiárias presas às flechas. No início do século XVI, Jean de Lery já descreveu o processo que os índios utilizavam para fiar e tecer o algodão. Em 1576, o português Gandavo informou que as camas eram de redes de fios de algodão e, Soares de Souza, mais tarde, revelou que o algodão tinha para os indígenas outras utilidades: com o caroço esmagado e cozido, faziam mingau, e, com o sumo das folhas curavam feridas (Freire, 1997). E, a influência portuguesa permitiu o desenvolvimento da cultura nos estados do Pará, Maranhão, Ceará, Pernambuco e Bahia (Freire, 1997).

1.2 Cultivo do Algodão no Brasil

A cultura do algodão atingiu, durante as décadas de 1960 e 1970, mais de três milhões de hectares plantados nas regiões Centro-Sul e Nordeste, caracterizando-se por uma agricultura de pequenas áreas e baixa tecnologia. Na década de 1980 a cultura praticamente não resistiu à entrada de uma nova praga, o bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis*), reduzindo a produtividade e provocando uma inversão na cotonicultura, tornando o Brasil de grande exportador para maior importador do mundo. Este decréscimo na área plantada pode ser claramente notado na safra de 1997, onde apenas 657.000 hectares foram plantados (CONAB, 2006).

Diante deste cenário, a busca por novos espaços foi imediata e, espelhando-se no desenvolvimento da soja e do milho na região do cerrado, a cotonicultura migrou principalmente para o centro-oeste tornando-se uma cultura de grandes áreas e de alta tecnologia. Esta nova visão foi traçada por volta de 1986, quando foram realizados os primeiros testes com a cultura na região do cerrado. Naquela época os produtores notaram que a viabilidade e a estabilidade da cultura, na nova fronteira agrícola, dependeriam da geração de tecnologias adequadas às condições sócio-econômicas da região Centro-Oeste (Beltrão, 1999).

A partir da safra de 1998, o progresso pode ser notado no estado do Mato Grosso, que aumentou rapidamente sua produtividade, alcançando um crescimento de 536,25%. Em 2000, passou de 42,26 mil hectares para 268,87 mil hectares, aumentando a produtividade em 82,21%. Dados da CONAB (2006) indicam que a área plantada com a cultura do algodão no Brasil nas safras de 2004/2005 foi de 1.179 mil hectares revelando um expressivo crescimento estimado de 37% em relação às safras anteriores (2002/2003 e 2003/2004). O sucesso da produção deve-se à utilização de cultivares adaptados e de modernas técnicas de cultivo, elevando desta forma o padrão tecnológico, bem como os rendimentos. Sendo assim, os danos causados pelas pragas foram de certo modo controlados. (Richetti e Melo Filho, 2002).

Mas de modo contrário, os produtores que persistiram no cultivo do algodoeiro nos estados de São Paulo, Paraná e Nordeste continuaram a sofrer drasticamente os danos do bicudo-do-algodoeiro. Este fato pode ser observado na última safra (2004/2005), onde apenas 400 mil hectares foram plantados, sendo a produção total 57% menor que a produção do Centro-Oeste.

1.3 As pragas do algodoeiro

O algodoeiro é dentre todas as plantas domésticas e cultiváveis, uma das mais atacadas por doenças e pragas, além de apresentar alta sensibilidade à ocorrência imposta por plantas daninhas (Beltrão, 1999). As pragas atingem desde as raízes até a parte aérea da planta. Os níveis populacionais das pragas variam de região para região, dentro de uma mesma região e de uma safra para outra, podendo, ocasionar sérios prejuízos à cultura (Beltrão, 1999).

Isso ocorre devido ao fato do algodoeiro possuir inúmeras glândulas, denominadas nectários, que produzem uma secreção líquido-resinosa açucarada, que faz com que sua cultura seja uma das mais atrativas para os insetos. Os gastos com defensivos para o controle de pragas representam a maior parcela dos custos de produção, chegando a 28% dos gastos totais (Santos, 2002).

Destacam-se como insetos fitófagos predadores do algodoeiro, responsáveis pela redução da produção e ou da qualidade da fibra: o bicudo-do-algodoeiro – *Anthonomus grandis*, o curuquerê – *Alabama argilacea*, a lagarta-da-maçã – *Heliothis virescens*, a lagarta-rosada – *Pectinophora gossypiella* e a lagarta-do-

cartucho-do-milho – *Spodoptera frugiperda*. Dentre estas, o bicudo-do-algodoeiro, representa uma das pragas mais sérias da cotonicultura do continente americano, a qual contribuiu significativamente para a inviabilização da cultura nos estados do Centro-Sul (Silvie *et al.*, 2001).

1.3.1. Bicudo-do-Algodoeiro (*Anthonomus grandis*, Coleoptera Boheman, 1843)

O bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis*, Boheman, 1843), invadiu os plantios de algodão dos Estados Unidos, em Brownsville, TX, por volta de 1892. Considerado como uma das pragas mais sérias da cultura do algodão, encontra-se disperso no México, Cuba, Haiti, Venezuela, Colômbia, Paraguai e Brasil (Haynes e Smith, 1992). Pertence à família Curculionidae, subfamília *Anthonominae*, caracterizando-se por utilizar os botões florais e frutos do seu hospedeiro como fonte de alimento e local de desenvolvimento, causando prejuízos diretos à comercialização da fibra de algodão (Haynes e Smith, 1992). No Brasil, a introdução do bicudo ocorreu em fevereiro de 1983, na região de Campinas – SP e em julho do mesmo ano, na Paraíba. Sua rápida disseminação ocorreu devido a sua alta mobilidade e adaptabilidade a novos ambientes.

Os níveis de infestação crescem rapidamente e os prejuízos podem atingir até 100% da produção, caso as medidas de controle não sejam adequadas. Representa um grande potencial de dano, sendo considerado praga-chave no planejamento e controle dos insetos nocivos à cultura, principalmente devido à dificuldade de controle pelos inseticidas químicos (Haynes e Smith, 1992). Essa dificuldade ocorre devido ao seu ciclo de vida, na fase larval, ocorrer dentro dos botões florais e maçãs.

O adulto do bicudo possui coloração cinza ou castanha, com aproximadamente 7 mm de comprimento e apresenta um bico com cerca de 2 mm. A reprodução sexuada do bicudo se inicia quando os botões florais atingem cerca de 6 mm de diâmetro. Os ovos são depositados isoladamente nos botões florais (7 a 11 ovos/fêmea/dia), atingindo um total de 150 ovos por fêmea, durante um período de 21 dias. Tipicamente, o período de eclosão é de três dias, seguindo-se do desenvolvimento das larvas em três ínstaras, os quais duram em média de 2 a 4 dias, cada um. Um ou dois dias após a primeira muda de pele da larva, o botão

floral infectado cai ao solo e a larva continua seu desenvolvimento, por cerca de 10 a 11 dias, empupando e tornando-se um novo adulto (Fundação, 2001)

O ciclo de vida de ovo a adulto se completa em aproximadamente 20 dias. Os adultos se alimentam nos botões florais e, na ausência destes, ou sob forte pressão populacional, as maçãs também são atacadas. As larvas que se desenvolvem no interior das maçãs dão origem a adultos mais aptos para sobreviver durante a entressafra. Quando não existem estruturas de frutificação (botões e maçãs), os adultos se alimentam de folhas cotiledonares, dos pecíolos das folhas e de ponta de haste, podendo permanecer de 30 a 40 dias, durante a safra, alimentando-se e ovopositando nos botões florais (Fundação, 2001).

Na época da colheita do algodão, o bicudo se abriga em refúgios localizados nos abrigos permanentemente vegetados (matas auxiliares e capinzais) ou nas soqueiras aguardando o novo plantio. Nesses locais de refúgio, os adultos permanecem com seu metabolismo fisiológico reduzido, alimentando-se esporadicamente de grãos de pólen de diferentes espécies vegetais. Nessas condições, muitos indivíduos sobrevivem à safra seguinte, pois estes locais são atingidos unicamente por inseticidas sistêmicos, cuja aplicação exige um investimento que pode chegar a 25% do valor do produto, o que inviabiliza a produção, principalmente na região nordeste do Brasil (Fundação, 2001).

O período compreendido entre os 40 e 90 dias se constitui na fase crítica de ataque do bicudo para o algodoeiro. As plantas de algodão de lavouras recém-emergidas exercem atração sobre grupos de bicudos sobreviventes da entressafra. O ataque se inicia a partir de bordaduras da cultura através de danos às partes vegetativas das plantas, como folhas, pecíolos e gemas apicais. Os adultos imigrantes das matas geralmente se estabelecem nas bordaduras. Estes adultos permanecem nestes locais, aguardando a emissão de botões florais, que acontece a partir dos 35 dias. Sob níveis normais de população, em função do manejo adequado da praga, as infestações podem permanecer nas bordaduras das lavouras até os 70 dias. Mas, a partir desta fase ocorre um processo de dispersão acelerada do inseto em toda a área (Beltrão, 1999).

Desde a introdução do bicudo, tecnologias de semicontrol e de convivência com essa praga têm sido desenvolvidas, através da utilização de cultivares precoces e do estabelecimento de genótipos que apresentam frutificação concentrada.

1.3.2. Lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*, Lepidoptera, Smith, 1797)

A lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*, Smith, 1797), um inseto polífago, pertencente à ordem Lepidoptera, família Noctuidae, encontrou no algodoeiro outra fonte de alimento, ocasionando danos desde a emergência até a maturação das plantas. A lagarta-do-cartucho é caracterizada por atacar diversas culturas de importância econômica, como milho, sorgo, arroz, trigo, alfafa, feijão, amendoim, tomate, algodão, batata, repolho, espinafre, abóbora e couve (Cruz *et al.*, 1999).

A lagarta-do-cartucho mede cerca de 40 mm de envergadura e o comprimento do corpo é de 15 mm, de coloração pardo-escuro nas asas anteriores e branco-acinzentada nas posteriores, podendo apresentar longevidade de 12 dias. Seus ovos são depositados sob as folhas e nas brácteas dos botões florais e maçãs, em grupos de 50 a 300 ovos, podendo alcançar 1500 a 2000 ovos por fêmea (Cruz *et al.*, 1999). O período de incubação dos ovos é de aproximadamente três dias sob temperaturas variando entre 25 e 30 °C. Em temperaturas inferiores a 25 °C esse período pode se prolongar até dez dias. Inicialmente, o ovo é de coloração verde-clara, passando a uma coloração mais alaranjada após 12-15 h. Próximo a eclosão das larvas, o ovo mostra-se escurecido devido a coloração negra da cabeça da larva, vista atrás da casca. Os ovos são cobertos por pêlos e por uma camada fina e longa de escamas, deixadas pela fêmea por ocasião da postura.

Ao final do período de incubação, as lagartas recém-eclodidas alimentam-se da própria casca do ovo. Após a primeira alimentação, permanecem em repouso em um período de 2-10 h. Quando encontram o hospedeiro ideal, raspam a face abaxial das folhas, deixando-as necrosadas ou translúcidas. A seguir estas lagartas infestam plantas ao redor, soltando-se ao vento através de fios que tecem, distribuindo-se uniformemente na área cultivada. As lagartas adultas fazem buracos nas folhas podendo destruir completamente pequenas plantas.

Os danos causados acometem as folhas, botões florais, flores e maçãs. Ocorrem também a destruição dos limbos e a perfuração das folhas, respeitando as nervuras principais no talo (Santos, 2002).

As lagartas pequenas são mais facilmente controladas pelos inseticidas, enquanto as mesmas estão sobre as folhas para se alimentarem. As lagartas

médias e grandes apresentam as mesmas dificuldades de controle do bicudo, uma vez que se alimentam das estruturas internas das flores e maçãs, se tornando alvos de difícil controle.

1.4 Geração de tecnologia para controle de pragas

O algodoeiro e suas pragas coexistem por um longo período evolutivo. Planta e inseto formam um sistema morfológico e bioquímico interdependente e competitivo resultando, na maioria das vezes, na utilização de parte da planta pelo inseto. Essa parte utilizada é o dano causado pelo inseto à planta, e depende do tamanho da população da praga, e da habilidade da planta de resistir ao ataque e de se recuperar do dano sofrido (Beltrão, 1999).

A interação planta versus inseto pode ser visualizada de pelo menos duas maneiras: do ponto de vista do inseto, com a planta variando de adequada a completamente inadequada como hospedeira e, por outro lado, do ponto de vista da planta onde, quanto menor o número de espécies e abundância de insetos associados a ela, e quanto menor o efeito que esses insetos exercem sobre elas, maior a sua resistência sobre esses insetos (Santos, 2002).

Entre um extremo e outro de resistência das plantas às pragas, existe um completo e extensivo arsenal de mecanismos de ataque e contra-ataque a ação dos insetos, que vão desde um simples impedimento morfológico a complexos componentes fitoquímicos, que interferem diretamente no processo metabólico envolvido na utilização da planta como hospedeira do inseto. Em termos práticos, a resistência do algodoeiro às pragas representa a habilidade de certas cultivares produzirem algodão de melhor qualidade em maior quantidade que outros cultivares, sob ataque da mesma população de insetos-praga (Freire, 1997).

Na maioria dos países onde o algodão é cultivado, a vulnerabilidade às pragas representa o principal problema desta cultura. Sem alternativas de controle mais eficazes, os produtores de forma rotineira, continuam acreditando que os inseticidas químicos são a única forma de proteção das lavouras. Embora eficientes, estes são onerosos, potencialmente danosos ao homem, ao meio ambiente e a longo prazo ocasionam o desencadeamento de processos de resistência, ressurgimento de pragas e redução na incidência de inimigos naturais

(Panizzi 1977). Por isso, táticas alternativas ao uso de inseticidas químicos são, hoje em dia, extremamente desejadas.

A introdução estável de genes exógenos em plantas de algodão, com a finalidade de induzir resistência a insetos-praga, é uma excelente alternativa para a diminuição de grande parte dos problemas associados aos métodos químicos. Esta tecnologia reúne várias vantagens, principalmente a de não poluir o ambiente. Dados gerais mostram que as plantas transformadas de algodão não apresentaram efeitos negativos sobre o ambiente e produção, sendo as características herdáveis e expressas normalmente na planta (Adamczyk *et al.*, 2001).

A disponibilidade de microrganismos e compostos orgânicos na natureza para utilização biológica é muito grande, e fornecem ampla variedade de matéria-prima para o desenvolvimento de novos produtos com maior patogenicidade contra o inseto e largo espectro de ação. Dentre esses microrganismos, uma grande descoberta foi à utilização de *Bacillus thuringiensis* como agente de controle biológico e como fonte de moléculas potenciais para programas biotecnológicos, destinados à obtenção de plantas transgênicas resistentes às pragas. Com esta estratégia é possível reduzir a níveis toleráveis as populações de pragas agrícolas de interesse econômico (Perlak *et al.*, 1990).

1.5 *Bacillus thuringiensis*

B. thuringiensis (Bt) é uma bactéria de solo, anaeróbica facultativa, Gram-positiva, flagelada, esporulante, caracterizada por sua forma de bastão e pela presença de inclusões cristalinas protéicas (ICP ou Cry) (Whiteley e Schnepf, 1986; Benintende e Marquez, 1996). Sua primeira descrição foi realizada pelo bacteriologista japonês, Ishiwata, em 1901, que isolou a bactéria de larvas mortas de *Bombyx mori* (bicho-da-seda). Em 1911, Berliner isolou um organismo similar, a partir de larvas mortas de *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), no distrito de Thuringia, Alemanha, denominando-o de *Bacillus thuringiensis*. Em 1916, Aoki e Chigasaki demonstraram que a atividade inseticida era devida a uma inclusão protéica (toxinas Cry), presente nas culturas de células vegetativas. A bactéria Bt pode ser sistematicamente classificada como: Classe: Firmibacteria; Ordem: Eubacteriales; Família: Bacillaceae; Gênero: *Bacillus*; Espécie: *B. thuringiensis* (Whiteley e Schnepf, 1986).

Este microrganismo tem sido amplamente utilizado como agente de controle biológico de pragas agrícolas e vetores de doenças há mais de 50 anos, com um mercado estimado em 60 a 80 milhões de dólares por ano, correspondendo a cerca de 2% do total desse mercado. Pesticidas baseados nas toxinas Cry geralmente têm baixo custo de desenvolvimento e registro. Inúmeras considerações são feitas em relação ao desenvolvimento de produtos a base de Bt, pois ao contrário dos inseticidas químicos, não deixam resíduos no ambiente (Schnepf *et al.*, 1998).

Quanto a sua toxicidade, as toxinas Cry são caracterizadas por não serem nocivas a mamíferos, aves, peixes, anfíbios ou répteis, sendo desta forma, específicas a grupos de insetos e alguns invertebrados. Seu modo de ação difere completamente do modo de ação dos pesticidas químicos, fazendo das toxinas Cry componentes-chave do manejo integrado de pragas (MIP), preservando os inimigos naturais e permitindo o manejo de resistência.

As principais limitações das formulações convencionais de Bt vêm a ser seu restrito espectro de ação, dificuldades de acesso a algumas pragas (tais como aquelas que se alimentam de tecidos internos de plantas ou raízes) e limitada persistência no campo, devido a degradação por fatores ambientais diversos. Essas restrições podem ser superadas através de processos biotecnológicos, pela utilização da tecnologia do DNA recombinante, a qual permite a introdução de genes exógenos em um determinado organismo possibilitando a obtenção de plantas transgênicas.

Atualmente, mais de 300 genes *cry* foram determinados e classificados em 40 grupos de diferentes subgrupos, com base na identidade da seqüência de aminoácidos (Bravo *et al.*, 1998). A atualização constante desta nova classificação se encontra disponível no site [www.http://epunix.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/ver.html](http://epunix.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/ver.html). As toxinas para insetos da ordem Coleoptera são as toxinas Cry3, Cry7, e Cry8, bem como, Cry1B e Cry1I, as quais apresentam dupla atividade contra lepidópteros e coleópteros (Bravo *et al.*, 1998).

Vários fatores de virulência podem ser produzidos pelo Bt, além das proteínas cristal, incluindo proteínas tóxicas com atividade inseticida como a α -exotoxina, β -exotoxina, hemolisinas, enterotoxinas, quitinases e fosfolipases (Hansen e Salamitou, 2000). Por outro lado, o esporo também pode contribuir para a patogenicidade através de sinergismo com as proteínas cristal (Johnson *et al.*,

1998). Todos esses fatores podem atuar em sinergia, mas a exata contribuição desses fatores ainda não é totalmente conhecida.

1.5.1. δ -endotoxinas

As δ -endotoxinas, ou proteínas cristal são produzidas durante o processo de esporulação. A morfologia das inclusões parasporais varia entre as subespécies, de acordo com a composição das δ -endotoxinas e, até certo ponto, com as condições do meio de cultura (Gill *et al.*, 1999). A maioria das estirpes pode sintetizar mais de um tipo de cristal (Lereclus *et al.*, 1993; Aronson, 2002) e esses cristais podem ser formados por uma ou várias δ -endotoxinas, como por exemplo, Bt subsp. *israelensis* que contém pelo menos quatro proteínas no cristal (Lereclus *et al.*, 1993). O alinhamento das seqüências de aminoácidos permite uma visão das relações evolutivas entre as diferentes classes de genes *cry*, revelando a presença de cinco blocos conservados, o que sugere que eles sejam importantes para a função biológica dessas proteínas, principalmente, por se localizarem nas regiões internas da proteína e na região de contato entre domínios (De Maagd *et al.*, 2003). A comparação de 1000 resíduos da região C-terminal sugere a presença de três blocos adicionais. A Figura 1 mostra a presença ou ausência desses blocos em grupos da família dessas toxinas. O primeiro grupo é formado pelas proteínas Cry1, Cry3, Cry4, Cry7, Cry8, Cry9 e Cry10 que são muito relacionadas e suas toxinas ativas compartilham cinco blocos de significativa homologia (Hofte e Whiteley, 1989; Lereclus *et al.*, 1993; Baum e Malvar, 1995). Um segundo grupo é formado pelas proteínas Cry5, Cry12, Cry13, Cry14 e Cry 21 onde observamos homologia entre os blocos 1, 2, 4 e 5, sendo encontrada uma variabilidade do bloco conservado 1 em relação aos grupos 1 e 2. As proteínas do segundo grupo apresentam uma variante no bloco 2 e o terceiro bloco completamente ausente (Schnepf *et al.*, 1998). Para ambos os grupos apresentados, quando a proteína apresenta a região C-terminal os blocos 6, 7 e 8 estão invariavelmente presentes. O terceiro grupo é formado pelas proteínas Cry2, Cry11 e Cry18, constituídos pelo bloco 1 e uma variante truncada do bloco 2, mas existindo significativa homologia com os outros blocos conservados (Crickmore *et al.*, 1998).

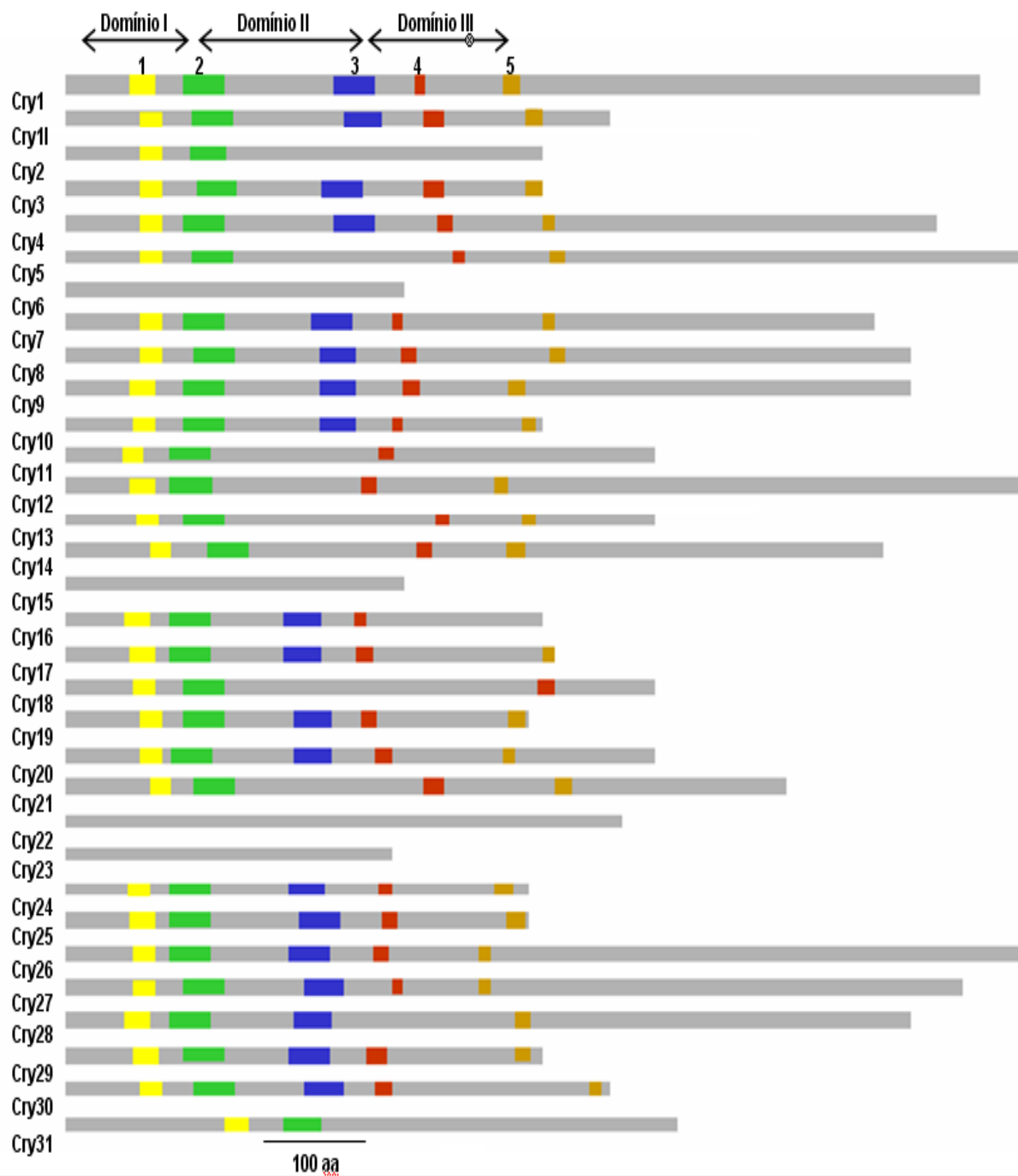


Figura 1. Alinhamento da estrutura protéica primária das toxinas Cry. As regiões coloridas correspondem às seqüências conservadas. Domínios I, II e III correspondem à porção da toxina ativa. Imagem adaptada de De Maagd *et al* (2001).

1.5.2. Estrutura tridimensional das proteínas Cry

Algumas toxinas Cry já tiveram suas estruturas tridimensionais resolvidas como, Cry3A, Cry1Aa e Cry2Aa mostrando que estas são formadas por três domínios estruturais. O domínio I, responsável pela formação do poro, possui 7 α -hélices, sendo 6 hélices anfipáticas ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 6$ e $\alpha 7$) circulando uma hélice central (Li *et al.*, 1991; Grochulski *et al.*, 1995; Morse *et al.*, 2001). O domínio II é formado por três folhas β -antiparalelas ao redor de um cerne hidrofóbico, terminando em alças no ápice da molécula (Shimizu e Morikawa, 1996) e o domínio III consiste de duas folhas β -antiparalelas formando um β -sanduíche. Os domínios II e III estão envolvidos no reconhecimento e ligação ao receptor (Morse *et al.*, 2001). Acredita-se que o domínio III esteja fortemente envolvido com a estabilidade estrutural (De Maagd *et al.*, 2001).

1.5.3. Mecanismo de ação das proteínas Cry

Os sintomas observados a partir do momento em que as larvas dos insetos susceptíveis ingerem os cristais e esporos são: parada alimentar, paralisia do intestino, vômito, diarreia, paralisia total e finalmente a morte (Aronson *et al.*, 1986). Estudos histopatológicos mostraram que as células colunares do intestino médio são afetadas inicialmente em sua microvilosidade apical, a qual é totalmente destruída (Garcia-Robles *et al.*, 2001). Embora os efeitos nas células calciformes sejam mais lentos, a citólise também é observada.

O mecanismo de ação das proteínas Cry é um processo que pode ser dividido em etapas. A solubilização dos cristais no intestino dos insetos é a primeira etapa, onde o cristal protéico é solubilizado devido ao pH extremamente alcalino do intestino da maioria dos insetos, expondo deste modo, as toxinas que o compõem (Grigorten *et al.*, 1992). Essas toxinas em solução são então ativadas por proteases existentes no intestino médio dos insetos ocorrendo a perda das porções N-terminal e C-terminal da proteína, liberando um monômero, de aproximadamente 60-70 kDa, conhecido como fragmento tóxico (Grochulski *et al.*, 1995). O monômero liga-se, então, a receptores específicos presentes na região apical da membrana das células do intestino médio do inseto (Hofmann *et al.*, 1988; Bravo *et al.*, 1992). Em lepidópteros, a toxina Cry1Aa liga-se a uma aminopeptidase (APN) de 120 kDa

(Knight *et al.*, 1994; Sangadala *et al.*, 1994; Gill *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1996) e proteínas do tipo caderina (Bt-R₁) de 210 kDa em *Manduca sexta* (Vadlamudi *et al.*, 1995). Quando realizados estudos de interação e especificidade das tóxicas Cry com estes receptores foram notadas diferenças de afinidade de ligação onde a forte interação com as caderinas Bt-R₁ sugerem um primeiro evento de interação da toxina com as microvilosidades da membrana (Vadlamudi *et al.*, 1993). Após esta ligação, o contato intermonomérico de 4 moléculas forma uma estrutura oligomérica, conhecida como pré-poro que subseqüentemente se insere na região apical da membrana para formação do poro (Vie *et al.*, 2001; Gomez *et al.*, 2002; Rausell *et al.*, 2004). Evidências de estudos recentes mostram que aminopeptidases e caderinas interagem de modo consecutivo com diferentes estruturas da toxina. Inicialmente, o fragmento tóxico se liga com as caderinas ocasionando a primeira modificação conformacional da proteína. Esta modificação expõe a região da primeira α -hélice que é proteoliticamente clivada por uma protease de membrana, expondo desta forma, a proteína que tende a formar o tetrâmero, complexo pré-poro (Gomez *et al.*, 2002). Este oligômero liga-se então a aminopeptidase, a qual está ancorada na membrana, através de glicosilfosfatidilinositol (GPI), coordenando o complexo para a membrana, causando a inserção e subseqüente formação do poro (Bravo *et al.*, 2004).

Experimentos de proteção osmótica demonstraram que, após unirem-se ao receptor e inserirem-se na membrana, as proteínas Cry formam poros com um diâmetro de 1 a 2 nm (Knowles e Ellar, 1987). Assim, as células epiteliais morrem por inativação do sistema que mantém o gradiente de pH (Wolfersberger, 1992) e por citólise osmótica (Knowles e Ellar, 1987). As toxinas Cry aumentam a permeabilidade das microvilosidades apicais a cátions, ânions, água e moléculas de maior tamanho. Isto causa um colapso na diferença de potencial e, portanto, perda de força motriz que dirige a entrada de aminoácidos ao interior celular, assim como a redistribuição dos cátions entre o lúmem e o citoplasma. O efeito mais devastador desse processo é a alcalinização do citoplasma que interfere no metabolismo celular normal e tem, como conseqüência final, a destruição do epitélio intestinal (Harvey, 1992; Wolfersberger, 1992). Uma vez destruídas as células colunares e caliciformes, os esporos de Bt têm acesso à hemolinfa, causando a morte das larvas por inanição e septicemia.

1.5.4. Organização dos genes *cry*

Com o uso de sondas homólogas de genes que codificam as δ -endotoxinas, ficou evidente que, na maioria das estirpes, os genes *cry* estão localizados em plasmídeos de grande tamanho (Lereclus *et al.*, 1993). Eventualmente, esses genes podem estar localizados no cromossomo, ou, ainda, em ambos.

Os perfis plasmidiais de inúmeros isolados, representando a maioria das subespécies de Bt, revelaram que esta bactéria contém um complexo conjunto de elementos extra-cromossômicas, possuindo de 1-17 plasmídeos com tamanho variando entre 1 e 200 MDa (Baum e Malvar, 1995). O potencial de codificação genética desses elementos pode atingir cerca de 10 a 20% do total do genoma da bactéria. Muitos destes plasmídeos têm baixa massa molecular (<10 MDa) e são crípticos. Na maioria das estirpes, os genes *cry* são encontrados em plasmídeos de alta massa molecular (>30 MDa) (Lereclus *et al.*, 1993).

A conjugação entre linhagens de Bt, inclusive com a transferência de genes *cry*, ocorre pela troca de plasmídeos conjugativos de alta massa molecular, com alta capacidade de mobilização por plasmídeos de baixa massa molecular (Battisti *et al.*, 1985; Reddy *et al.*, 1987).

A descoberta de que várias cópias idênticas de um mesmo gene poderiam estar presentes dentro de uma mesma estirpe e localizadas em diferentes replicons, indicou que fenômenos de recombinação ou de transposição poderiam estar implicados na disseminação e diversidade dos genes das proteínas cristal (Mahillon *et al.*, 1994). De fato, a maioria desses genes está estruturalmente associada a elementos móveis. Atualmente, 17 seqüências de inserção (IS) e duas classes de transposons já foram identificadas e caracterizadas em Bt.

A associação dos processos de conjugação e mobilização dos genes de δ -endotoxinas, mediada pelos elementos móveis, adjacentes a estes, pode ter contribuído para a origem da multiplicidade e diversidade das proteínas Cry, apresentadas pelas inúmeras estirpes de Bt. Por sua vez, esta diversidade confere um potencial adaptativo extremamente forte a esta bactéria em termos de inseto alvo.

1.6 Desenvolvimento de plantas transgênicas: Importâncias e Perspectivas

A ciência move-se rapidamente no campo da biologia molecular, abrindo novas perspectivas à geração de plantas melhoradas. As ferramentas biotecnológicas apresentam-se como fortes aliadas dos métodos de melhoramento clássico, permitindo a transferência de informações genética entre espécies de gêneros, famílias e, até mesmo, reinos distintos. Em toda a história da ciência, nunca houve uma tecnologia com tamanha rapidez de aceitação como a engenharia genética.

O setor agrícola mundial inseriu-se nesta era biotecnológica, aderindo ao uso de plantas transgênicas, com resistência a pragas, herbicidas, vírus, entre outras. Os países que adotaram a tecnologia apresentaram incremento na produtividade e redução no custo de produção. E isso pode ser observado, pela área global com plantas transgênicas cultiváveis, que cresce anualmente em uma velocidade intensa. Em 1996, foram cultivados 1,7 milhões de hectares com plantas transgênicas, e em 2003 os índices mostram um aumento da área, que atinge 59 milhões, somente com soja, algodão, milho e canola. Em 2004, esta área chegou a 67,7 milhões de ha, sendo que 22 milhões correspondem a plantas que expressam genes *cry* (CONAB, 2006).

Inúmeros genes *cry* têm sido introduzidos em plantas como fumo, tomate, batata, algodão, milho e outras (Perlak *et al.*, 1990), inclusive com modificações genéticas e fusões de genes, resultando num espectro de ação mais amplo. Na China, estudos mostram que, ao final da produção, 60% dos custos finais são reduzidos com a utilização de algodão transgênico (Ferry *et al.*, 2006). Além destes benefícios, a produtividade torna-se elevada em função do melhor controle de pragas.

Atualmente, os Estados Unidos contribuem com 39 milhões de ha cultivados com plantas transgênicas, a Argentina com 13,5 milhões e a China com 3 milhões (Raney, 2006). Sendo que os Estados Unidos e a China desenvolvem suas tecnologia adequada à realidade local, tornando-se grandes competidores mundiais. Assim, faz-se necessário o desenvolvimento desta tecnologia no Brasil para a geração de um produto com competitividade mundial para, em um futuro próximo, despontar dentre os maiores exportadores de fibra de qualidade.

2. JUSTIFICATIVA

Embora existam cultivares estrangeiros de algodão transgênico com genes *cry*, nenhuma dessas apresenta resistência aos insetos-praga *A. grandis* e *S. frugiperda*. Sendo estas as principais pragas da cotonicultura brasileira, trata-se de um trabalho que busca genes *cry* potenciais à geração de um cultivar nacional de algodão transgênico resistente aos insetos-praga em questão.

3. HIPÓTESE

Os genes isolados da estirpe de Bt S811, *cry11a12* e *cry8Ha1*, podem ser ativos contra as pragas do algodoeiro (*A. grandis* e *S. frugiperda*), sendo importantes ferramentas à geração de uma cultivar brasileira resistente.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivos Gerais

Tendo em vista a importância econômica e social da cultura do algodão e os grandes danos causados pelos insetos-praga *A. grandis* e *S. frugiperda*, foi elaborado um projeto denominado Estratégias Moleculares para Controle das Pragas do Algodoeiro *A. grandis* e *S. frugiperda*. O conhecimento da base molecular da atividade inseticida das estirpes de Bt é fundamental quando se pretende otimizar esta atividade. Neste contexto, o presente trabalho objetivou realizar a caracterização morfológica dos cristais, o isolamento e expressão de genes codificadores de proteínas Cry da estirpe S811 de Bt, oriunda do banco de germoplasma de Bt da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Sendo o objetivo final deste trabalho, a avaliação da toxicidade das proteínas recombinantes para os insetos-praga de interesse.

4.2 Objetivos Específicos e Estratégias

4.2.1 Identificação e caracterização de estirpes de Bt ativas contra os insetos-praga do algodoeiro

Estratégias:

- I) Análise dos bioensaios previamente realizados;
- II) Purificação dos cristais da estirpe S811;
- III) Análise morfológica dos cristais e da estirpe utilizando microscopia eletrônica de varredura, confocal e de contraste de fase;
- IV) Análise do perfil protéico dos cristais purificados, assim como, o perfil protéico da estirpe S811.

4.2.2 Identificação de genes *cry* e produtos os quais possam estar envolvidos com a toxicidade das estirpes

Estratégias:

- I) Extração do DNA total da estirpe S811 para utilização do mesmo em ampliações de PCR utilizando oligonucleotídeos gerais para genes *cry* descritos por Bravo *et al* (1998);
- II) Seqüenciar e analisar os clones obtidos pela amplificação com auxílio de técnicas de bioinformática.

4.2.3 Clonagem dos genes que apresentaram potencial para o controle das pragas em questão

Estratégias:

- I) Utilização oligonucleotídeos específicos para amplificação dos genes já descritos na literatura;
- II) Utilização da técnica de TAIL-PCR para clonagem da seqüência completa de genes inéditos;
- III) Análise da seqüência completa dos genes com auxílio de ferramentas de bioinformática.

4.2.4 Expressão dos genes em sistema heterólogo com *Escherichia coli*;

Estratégias:

- I) Amplificação do fragmento que codifica a região dos três domínios estruturais dos genes de interesse utilizando oligonucleotídeos específicos;
- II) Clonagem do fragmento obtido em vetor de expressão pET101-D/TOPO (Invitrogen)
- III) Expressão dos genes em *E. coli* BL21 (DE) Star;
- IV) Otimização do sistema de expressão para obtenção de toxinas Cry recombinantes na forma ativa;
- V) Purificação de toxinas Cry recombinantes por cromatografia de afinidade por níquel (Ni-NTA).

4.2.5 Determinação da atividade biológica em bioensaios com larvas de insetos de *A. grandis* e *S. frugiperda*.

Estratégia:

- I) Testar a atividade inseticida das toxinas Cry recombinantes contra insetos *A. grandis* e *S. frugiperda* para futura utilização de seus produtos gênicos na geração de plantas de algodão transgênicas.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Caracterização protéica da estirpe S811

Em um trabalho prévio (Monerrat *et al.*, 2001), foi selecionada uma estirpe, entre Bts pertencentes ao Banco de Germoplasma Microbiano da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, com base na sua toxicidade contra os insetos *A. grandis* e *S. frugiperda*. A avaliação da toxicidade foi feita através de bioensaios seletivos nos quais foi utilizado o extrato protéico total das bactérias Bt. Foram consideradas efetivas as estirpes que apresentaram uma porcentagem de mortalidade superior a 50%.

5.1.1 Condições de cultivo

A estirpe S811, originária de amostras de solo, foi obtida na região Centro-Oeste do país (Monerrat *et al.*, 2001) e encontra-se depositada no Banco de Germoplasma Microbiano da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Para coleta utilizou-se o procedimento recomendado pela World Health Organization (1985). Em geral, as estirpes são cultivadas em caldo nutritivo (8 g/L caldo nutriente, 1 g/L extrato de levedura e 1 g/L de KH_2PO_4) a 30 °C, com agitação de 200 rpm por 12 h para obtenção da cultura na fase vegetativa, ou por 48–72 h para completa esporulação.

5.1.2 Preparação de misturas esporos-cristais ou extração de proteína total

As misturas esporos-cristais para análise das proteínas foram preparadas de acordo com o protocolo descrito por De Souza *et al.*, 1993. Uma determinada quantidade de cultura completamente esporulada foi transferida (48-72 h de cultivo) para um tubo Eppendorf e centrifugou-se a 10.000 g por 5 min (microcentrifuga Eppendorf). O sobrenadante foi descartado e o procedimento foi repetido três vezes. Ao final, ressuspendeu-se o precipitado em 0,15 M NaCl e centrifugou-se a 10.000 g por 20 min. Foram realizadas duas lavagens do precipitado com água milliQ estéril, contendo 1,0 mM PMSF. O produto final foi armazenado a -20 °C.

5.1.3 Análise das proteínas em gel de poliacrilamida (SDS – PAGE)

As preparações de esporos-cristais da estirpe S811 foram analisadas por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida a 10%, conforme procedimento descrito por Laemmli (1970). Este procedimento permitiu conhecer o perfil protéico e estimar a massa molecular das toxinas produzidas pela estirpe.

Em cada preparação foram utilizadas aproximadamente 25 µg de proteína diluídas em tampão de amostra de proteína contendo β-mercaptoetanol. Após aquecer a mistura a 100 °C por 5 min, o volume total de cada amostra foi aplicado no gel juntamente com 10 µL de marcador de alto peso molecular.

A eletroforese foi realizada em aparelho Mini Protean II Electroforesis Cell (Bio-Rad), contendo tampão de corrida 1 X (14,4 g Glicina; 3 g Tris-Base; 1 g SDS) a amperagem constante de 25 mA, por 60 min. Ao final da corrida, o gel foi corado em solução de azul de Coomassie por 60 min e descorado em solução descorante (40% de metanol e 12% de ácido acético) por 2 h.

5.1.4 Purificação de cristais

Para purificação de cristais foram adaptados os protocolos descritos por Thomas e Ellar (1983) e De Souza *et al.* (1993).

Dez placas de Petri contendo colônias crescidas até a total esporulação (48-72 h) tiveram, com a ajuda de uma alça de cromo-níquel, seu conteúdo recuperado em aproximadamente 20 mL de água destilada. O material obtido foi centrifugado a 10.000 g, por 10 min, e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi ressuspenso em 1 volume de solução contendo 0,1 mM PMSF e 0,01% Triton X-100. Esse procedimento foi repetido três vezes.

O sedimento final foi ressuspenso em 3 ml de solução contendo 1% Triton X-100, 0,05 M Tris HCl; pH 8,0 e 0,01 M NaCl. As frações solúveis e insolúveis da suspensão foram separadas após a exposição a ultra-som com três pulsos de 1 min, com um intervalo de 1 min entre cada pulso, para separar esporos de cristais e limpeza do material. O gradiente de sacarose foi montado em tubo de 30 mL Ultraclear (Beckman^R), nas seguintes concentrações: 84%, 79%, 72% e 69%, e acima deste, acrescentou-se a suspensão de esporos-cristais. O gradiente contendo a amostra foi então centrifugado a 23.000 rpm por 20 min, a 4 °C (ultracentrifuga

Sorvall, rotor AH 628). Após a centrifugação, a fração contendo os cristais foi retirada, entre a interface 79 e 84%, e diluída em igual volume de água. O material foi então centrifugado a 10.000 *g* por 10 min. O sobrenadante descartado e o sedimento ressuspenso em 1 mL de uma solução de 0,01% Triton X-100. Esse procedimento foi repetido duas vezes. O sedimento final foi ressuspenso em 0,1 mM PMSF e armazenado a -20°C .

5.1.5 Caracterização morfológica dos cristais

As suspensões de cristais purificados da estirpe S811, obtidas conforme descrito no item 5.1.4, foram liofilizadas e depositadas sobre suportes metálicos. As amostras foram cobertas com ouro por 180 s, utilizando-se metalizador EMITECH modelo K550, e observadas em microscópio eletrônico de varredura Zeiss modelo DSM 962.

Microscopia de luz foi realizada com as células ainda em estado vegetativo em microscópio Leica MPS 60, com e sem contraste de fase.

5.2 Identificação de genes *cry* na estirpe S811

5.2.1 Extração de DNA de *B. thuringiensis* (Método CTAB)

A purificação de DNA total teve como objetivo a obtenção de DNA com grau de pureza suficiente para amplificação por PCR. A metodologia utilizada foi realizada de acordo com o protocolo que utiliza 2% CTAB (p/v) adicionado de 0,2% de β -mercaptoetanol.

A estirpe foi cultivada em 30 mL de caldo nutritivo até alcançar a fase vegetativa (12-16 h de cultivo). Após este período, centrifugou-se o material em tubos de polipropileno a 4.000 *g* por 20 min. O precipitado de células foi congelado em nitrogênio líquido (77 K) e triturado com pistilo em almofariz de porcelana até formação de um pó fino. O material foi transferido para um microtubo para adição de CTAB 2%. O homogenato foi incubado a 65°C por 30 min. Posteriormente, adicionou-se 1 volume de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1; v:v) ao material, o qual foi levemente agitado e centrifugado a 10.000 *g* por 10 min. A fração aquosa foi separada da orgânica e transferida para outro recipiente onde acrescentou-se 2/3 do

volume de isopropanol para precipitação do DNA genômico. O material foi mantido por 5 min a temperatura ambiente e centrifugado a 10.000 g por 15 min. O precipitado foi lavado com 70% etanol gelado e centrifugado a 10.000 g por 5 min. O DNA foi ressuspensão em 50 µL de 20 mM Tris-HCl pH 8,0 e armazenado a -20 °C. As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro e analisadas em gel de agarose 0,8% (p/v).

5.2.2 Amplificação de DNA por PCR

Para identificar os genes codificadores de toxinas Cry na estirpe S811 foi utilizada a técnica de PCR (Reação da Polimerase em Cadeia). As reações foram realizadas em volumes de 25 µL contendo 2,5 µg de DNA total, 10 mM Tris-HCl pH 8,4, 2 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 200 mM de cada dNTP, 500 nM de cada oligonucleotídeo e 0,1 U/µL de *Taq* DNA polimerase, para cada amostra de DNA.

As amplificações foram realizadas utilizando oligonucleotídeos específicos para detecção de genes do grupo *cry1* (Ceron *et al.*, 1994; Ceron *et al.*, 1995) e *cry8* (Bravo *et al.*, 1998). As condições usadas para *cry1* no PCR foram as descritas por Cerón *et al.*, 1994 e as condições usadas para os oligonucleotídeos do grupo *cry8* foram as descritas por Bravo *et al.*, 1998, ambas resumidas na tabela 1. A amplificação foi realizada em termociclador (Mastercycler Gradient – Eppendorf) sob as seguintes condições: desnaturação prévia a 94 °C por 2 min; repetição de 30 ciclos a 94 °C por 45 s (desnaturação); anelamento dos oligonucleotídeos por 45 s; 72 °C por 2 min (extensão da DNA polimerase) e ao final uma extensão final 72 °C por 5 min. Após as reações de PCR, 15 µL de cada amostra foram misturados com 10 X de tampão de amostra e aplicados em gel de agarose com 0,5 % brometo de etídeo em tampão de 1 X TBE (10,8% Tris-Base; 5,5% Ácido Bórico; 0,6% EDTA pH 8.0).

Tabela 1. Descrição dos oligonucleotídeos utilizados nas ampliações por PCR.

Oligo	Tm	Seqüência	Autor
Cry1-gral (d)	65°C	5' TGTAGAAGAGGAAGTATATCC 3'	Cerón et al., 1995
Cry1-gral (r)	63°C	5' TACTTCCCAGAAACCGATA 3'	
Cry1-gral (d)	69°C	5' CTGGATTTACAGGTGGGGATAT 3'	Bravo et al., 1998
Cry1-gral (r)	70°C	5' AGTCAAATATGCGAAGCGACTCA 3'	
Cry8B-Spe (d)	62,5°C	5' ATGAGTCCAAATAATCAAATG 3'	Bravo et al., 1998
Cry8B-Spe (r)	69°C	5' GAGCCTTACGAGATGTTC 3'	

5.2.3 Clonagem dos produtos de PCR e transformação de clones

Os fragmentos amplificados por PCR foram separados e visualizados por eletroforese em gel 0,8% de agarose. Os fragmentos de DNA foram excisados do gel (utilizando-se lâminas novas), purificados utilizando-se o kit "GeneClean" (Bio 101 System) e quantificados por espectrofotometria. Os fragmentos purificados foram então ligados a 50 ng vetor comercial pGEM-T easy (Promega), na razão molar de 3:1 (inserto:vetor), com 4 U/ μ L T4 DNA ligase e tampão 1 X no volume final de 15 μ L quantidade necessária de produto purificado para a ligação foi estimada utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{ng do vetor} \times \text{tamanho do inserto (Kb)}}{\text{tamanho do vetor (Kb)}} \quad * \text{ razão molar (inserto:vetor) = ng do inserto.}$$

Para transformação do sistema de ligação em *E. coli* por eletroporação foram utilizados tubos com alíquotas de 40 μ L de células competentes de *E. coli* linhagem XL1-Blue. A alíquota foi descongelada e transferida imediatamente para o gelo. Adicionou-se 7,5 μ L de sistema de ligação, previamente dialisado. O conteúdo do tubo foi transferido (células e sistema de ligação) para uma cubeta de eletroporação estéril de 0,1 cm e aplicou-se a corrente em um eletroporador Bio-Rad Gene Pulser™ com os seguintes parâmetros: 1,8 kV de voltagem, 200 Ω de resistência e 25 μ F de capacitância. As células foram ressuspensas em 1,0 mL de meio LB e incubadas por 1 hora a 37 °C. As células foram plaqueadas em meio LB-ágar-amp e incubadas em estufa 37 °C por aproximadamente 16 h. Os clones resistentes a

ampicilina foram selecionados por α -complementação (1 mg de X-GAL e 2 mg de IPTG sobre o meio para cada placa contendo diâmetro de 70 mm) e confirmados por PCR de colônia.

5.2.4 Extração de DNA plasmidial

Clones positivos foram inoculados em tubos de vidro contendo 3,5 mL de meio LB-amp e incubados por aproximadamente 16 h a 37 °C em estufa a 300 rpm. Todo o material foi centrifugado por 2 min a 8.000 *g* e o sobrenadante foi descartado. O precipitado de células foi ressuspensionado em 300 μ L de solução I (20 mM Tris-EDTA). Logo após, foram adicionados 200 μ L de solução II (0,2 M NaOH; 1% SDS) e os tubos foram agitados manualmente por 5 min. Adicionou-se Solução III gelada (300 μ L de Acetato de potássio 3M; pH 5,5) e as amostras foram incubadas em gelo por 5 min e centrifugadas a 11.000 *g* por 10 min em microcentrifuga Eppendorf. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e 450 μ L de isopropanol gelado foi adicionado. Após nova centrifugação a 11.000 *g* por 10 min, o precipitado foi ressuspensionado em 150 μ L de TE e 82,5 μ L de NH₄Ac e novamente centrifugado a 10.000 *g* por 10 min. O sobrenadante foi recolhido e transferido para um novo microtubo e adicionou-se 525 μ L de etanol absoluto gelado. O material foi centrifugado a 10.000 *g* por 10 min para precipitação do DNA, que foi lavado com 500 μ L de 70% de etanol e, novamente, centrifugado a 10.000 *g* por 5 min. Ao final, o DNA foi ressuspensionado em 20 μ L de TE com RNase A a concentração final de 10 ng/ μ L e incubado a 37 °C por uma hora e posteriormente armazenado a -20 °C.

Para confirmação dos clones positivos foi realizada uma reação de digestão com a enzima de restrição *EcoRI* (Invitrogen), contendo 1 X de tampão apropriado para a enzima, 1 U de enzima e 1 μ L do produto obtido da extração plasmidial em 15 μ L de reação.

5.2.5 Seqüenciamento de DNA e análise computacional das seqüências

Os fragmentos clonados (500 ng de vetor) foram seqüenciados em um seqüenciador automático ABI, utilizando-se 4 pmoles de oligonucleotídeos gerais T7, SP6, reverso e universal. As seqüências obtidas foram submetidas contra o banco dados do GeneBank e SwissProt pelos programas “BLASTn” e “BLASTp”, pelo endereço eletrônico do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>). A seqüência consenso foi obtida pela análise dos alinhamentos múltiplos das seqüências dos fragmentos gênicos, através dos programas “gelassemble” e “pileup” do GCG (Universtiy of Wisconsin), para determinação da seqüência completa dos genes. A análise de domínios dos genes foi feita pelo programa “CDD-Search” (Marchler-Bauer *et al.*, 2003; Marchler-Bauer *et al.*, 2005) contra o banco de domínios conservados (Conserved Domain Database), também do NCBI, para determinação da identidade e similaridade, identificação de domínios conservados que podem estar associados ao domínio em questão e observação do contexto no qual tais domínios são observados. A massa molecular e ponto isoelétrico das proteínas preditas foram determinados por programas do “Expasy” (http://ca.expasy.org/tools/pi_tool.html e <http://www.up.univ-mrs.fr/cgi-wabim/a-compo-p.pl>). As seqüências também foram alinhadas pelo “CLUSTALW” (Thompson *et al.*, 1994) (<http://www2.ebi.ac.uk/clustalw/>) e o dendrograma resultante do alinhamento foi editado no programa “TreeView” (Page, 1996). Todos os oligonucleotídeos desenhados foram testados no programa “OligoTech”, que informa a T_m (temperatura onde metade dos oligonucleotídeos estão anelados) e a ocorrência de *loops* ou de homodímeros, assim como a energia necessária para romper estas estruturas indesejáveis.

5.3 Clonagem do novo gene *cry8*

Para a clonagem de genes *cry* foi feita uma amplificação inicial por PCR com oligonucleotídeos específicos para a família de δ -endotoxinas *cry8* como descrito no item 5.2.2. Amplificações subseqüentes com o objetivo de obter a seqüência completa do gene foram feitas por TAIL-PCR (Thermal Asymmetric Interlaced PCR), utilizando oligonucleotídeos específicos derivados das seqüências previamente amplificadas e oito oligonucleotídeos arbitrários.

O TAIL-PCR consiste numa aplicação da técnica de PCR que permite o isolamento de segmentos de DNA adjacentes a seqüências conhecidas (Liu *et al.*, 1995), utilizando para tal o DNA genômico do organismo. A técnica utiliza oligonucleotídeos específicos seqüenciais, junto a pequenos oligonucleotídeos arbitrários degenerados, de modo a controlar termicamente a eficiência de amplificação relativa de produtos específicos e inespecíficos. Intercalando-se ciclos de altas e baixas estringências, produtos específicos são preferencialmente amplificados sobre produtos não específicos.

Resumidamente, são feitas seqüencialmente três reações de PCR utilizando três oligonucleotídeos seqüenciais específicos de um lado e um oligonucleotídeo arbitrário do outro. É feito um ciclo inicial a baixa estringência de modo a permitir o anelamento do oligonucleotídeo arbitrário com o segmento alvo de seqüência desconhecida, seguido de alguns ciclos a alta estringência de modo a favorecer o anelamento do oligo específico e a amplificação linear da seqüência alvo. Alternando-se ciclos de altas e baixas estringências são formadas moléculas dupla fita e a amplificação da seqüência alvo torna-se logarítmica. Num segundo e terceiro ciclo de amplificações, produtos não específicos deixam de ser amplificados e são eliminados (figura 2).

Em etapa anterior foram desenhados oligonucleotídeos específicos ao gene *cry8*. Estes foram então utilizados em conjunto com os diferentes oligonucleotídeos arbitrários para amplificar, a partir do DNA da estirpe S811, a região do gene no sentido 3' contendo o restante da seqüência codificadora.

Fragmentos amplificados potencialmente positivos foram clonados no vetor pGEMT-easy (Promega) e seqüenciados em ambas as direções em um seqüenciador automático, como descrito nos itens 5.2.3, 5.2.4 e 5.2.5.

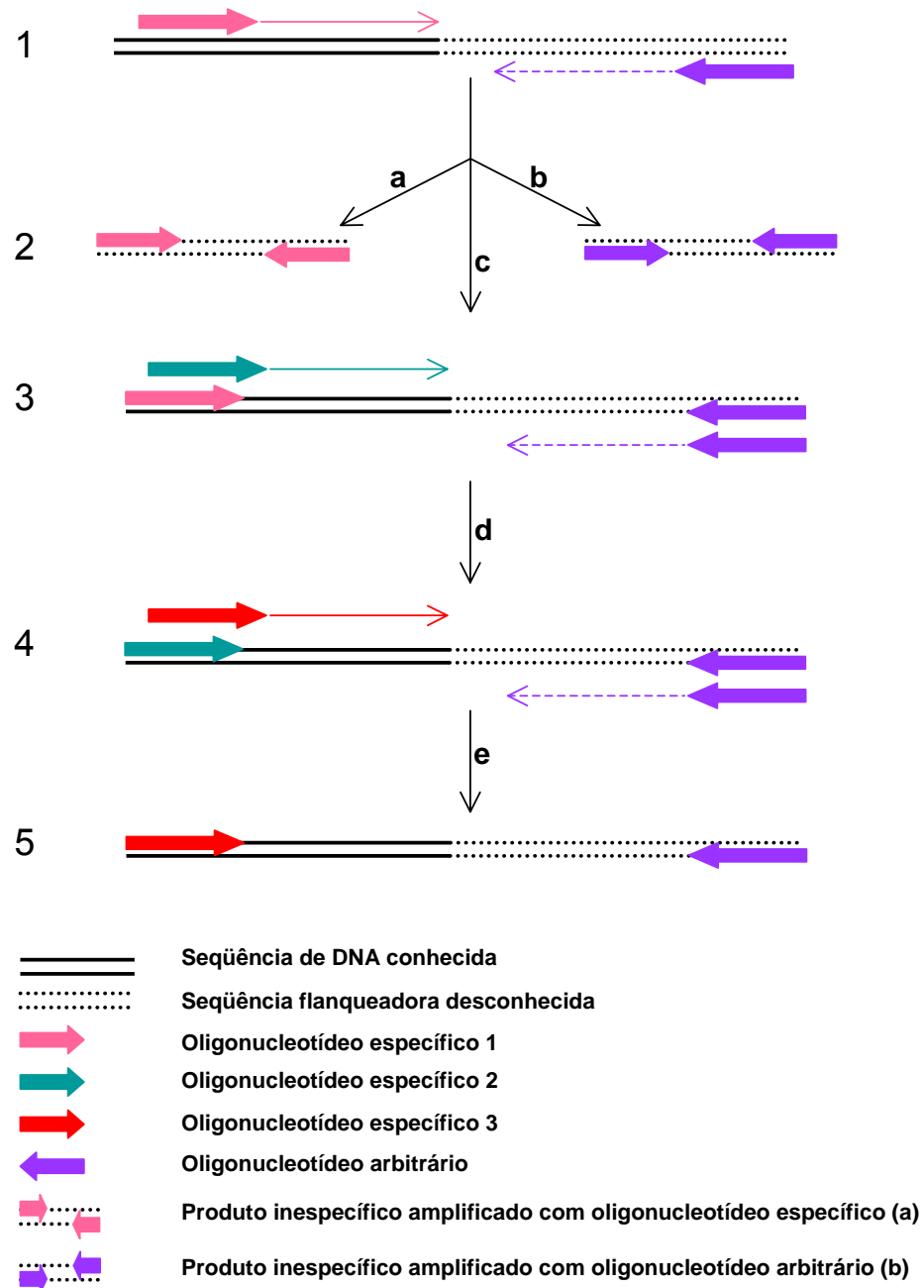


Figura 2: TAIL-PCR. Representação esquemática da técnica de TAIL-PCR (Liu *et al.*, 1995).

1. Primeira amplificação com os oligonucleotídeos específico 1 e arbitrário. 2. Resultado da primeira amplificação gerando produtos inespecíficos (a, b) e o produto específico (c). 3. Segunda amplificação com o mesmo oligonucleotídeo arbitrário e oligonucleotídeo específico mais interno gerando o segundo produto específico (d). 4. Terceira amplificação com o mesmo oligonucleotídeo arbitrário e o oligonucleotídeo específico 3 gerando o produto final (e). 5. Produto final específico.

5.4 Clonagem do gene *cry1I*

Após análise dos fragmentos clonados, como descrito no item 5.2.2, foram desenhados oligonucleotídeos específicos baseados em regiões altamente conservadas de outros genes *cry1I* descritos na literatura.

Estes oligonucleotídeos “sense” 5’ ATGAACTAAAGAATCAAGATAAGC 3’ e “antisense” 5’ CTAGATGTTACGCTCAATATGG 3’ foram então utilizados em uma reação de PCR simples como a descrita no item 5.2.2. A amplificação foi realizada sob as seguintes condições: desnaturação prévia a 94 °C por 2 min; uma repetição de 30 ciclos a 94 °C por 1 min (desnaturação); 55 °C por 1 min (anelamento dos oligonucleotídeos) e 72 °C por 2 min (Extensão da DNA polimerase) e ao final uma extensão 72 °C por 5 min. O produto da amplificação foi separado por eletroforese em gel de agarose 1,0% e purificado como descrito no item 5.2.3

A seqüência de DNA completa do gene está depositada no banco de dados GenBank com número de acesso AY788868.

5.5 Obtenção das toxinas recombinantes Cry1Ia12 e Cry8Ha1

5.5.1. Construção dos vetores de expressão *pET101/cry1Ia12* e *pET101/cry8Ha1*

Para identificar a região correspondente aos três domínios estruturais dos genes *cry*, as seqüências foram traduzidas, comparadas e alinhadas com outras toxinas Cry presentes nos bancos de dados. Os oligonucleotídeos foram desenhados com base no códon de iniciação (ATG) dos genes, com adição da seqüência CACC na região 5’ do oligonucleotídeo em orientação “sense”, segundo instruções do fabricante do sistema pET Directional TOPO cloning (Invitrogen). O oligonucleotídeo “antisense” não possui o códon de terminação, pois o mesmo encontra-se logo após a cauda de poli-histidina (figura 3).

Estes oligonucleotídeos foram então utilizados em uma reação de PCR com volume final de 25 µL, contendo 400 nM de cada oligonucleotídeo, 200 mM de dNTPs, 1 X do tampão para a enzima *pfu*, 2,5 U de DNA polimerase *pfu* (Stratagene) e 10 ng dos genes *cry* clonados no vetor pGEMT-easy (Invitrogen). A amplificação foi realizada em termociclador (Mastercycler Gradient – Eppendorf) sob

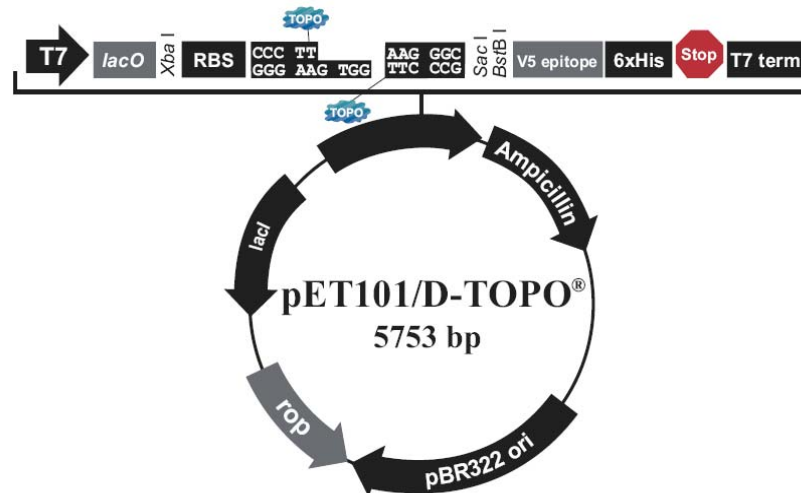
as seguintes condições: desnaturação prévia a 94 °C por 1,5 min; uma repetição de 30 ciclos a 94 °C por 1 min (desnaturação); 55 °C por 1 min (anelamento dos oligonucleotídeos) e 72 °C por 2 min (Extensão da DNA polimerase) e ao final uma extensão 72 °C por 5 min. O produto da amplificação foi separado por eletroforese em gel de agarose 1,0% e purificado como descrito no item 5.2.3.

O vetor de expressão pET101/D-TOPO foi adquirido na forma linearizada com uma extremidade abrupta e outra coesiva, complementar a extremidade do inserto amplificado (figura 4A).

Neste sistema, o produto de PCR é diretamente clonado pela adição dos quatro pares de bases do oligonucleotídeo de orientação “sense”. A extremidade coesiva do vetor de clonagem (GTGG) invade a extremidade 5' do produto de PCR, anelando-se com as quatro bases adicionadas (CACC) e estabiliza o produto de PCR na correta orientação. A topoisomerase então cliva a porção sobressalente do produto de PCR para que a ligação seja efetiva (figura 4B). Os insertos podem ser clonados desta forma com 90% de eficiência.

A reação de ligação foi realizada com 10 ng do produto de PCR, 200 mM de NaCl, 10 mM de MgCl₂, 1 µL do vetor pET101. A mistura foi incubada à temperatura ambiente, 25 °C, por 30 min. Células competentes de *E. coli* TOP10 foram transformadas com 3 µL do sistema de ligação (10 ng) por choque térmico. Para este procedimento, os 10 ng de DNA foram misturados a 200 µL de células competentes e a mistura incubada em gelo por 30 min. O choque térmico foi realizado por 3 min a 42 °C. As células foram imediatamente transferidas para o gelo e subseqüentemente foram adicionados 500 µL de meio de cultura SOC (2% triptona; 0,5% extrato de levedura; 0,05% NaCl; 2,5 mM KCl; 20 mM MgCl₂). As células em meio de cultura foram incubadas a 37 °C por 30 min e após este período foram plaqueadas em meio LB-Agar-amp.

Para verificação de clones positivos foi realizada uma PCR de colônia, a qual utilizou como molde o DNA das bactérias transformadas e as mesmas condições descritas para a clonagem dos genes. Os clones positivos foram então inoculados em 5 mL de meio LB-Amp e crescidos por 16 h a 37 °C a 200 rpm.



Promotor T7: Induzido por IPTG permite a expressão em larga escala em algumas linhagens de *Escherichia coli*.

Operon *lac* (*lacO*): Sítio de ligação do repressor *lac*, importante para a redução da expressão basal das proteínas recombinantes (sua função pode ser regulada pela presença ou ausência de glicose no meio de cultura).

RBS: Sítio de ligação do ribossomo, localizado acima da região 5' do gene a ser clonado na posição ideal para início do processo de tradução.

Sítio de clonagem TOPO: Região que compreende a localização exata de onde inserto será clonado.

Epitopo V5 (Gly-Lys-Pro-Ile-Pro-Asn-Pro-Leu-Leu-Gly-Leu-Asp-Ser-Thr): Utilizado para a detecção de proteínas recombinantes por western blot utilizando anticorpos anti-V5

6His C-terminal: Importante para a purificação de proteínas utilizando para tal resinas as quais possuem metal acoplado.

Terminador T7: Seqüência do bacteriófago T7 que permite a finalização da transcrição dos genes.

Promotor *bla*: Promotor do gene de resistência a ampicilina

Gene de resistência a ampicilina (β -lactamase): Seleciona os plasmídeos resistentes em *E. coli*.

Origem de replicação pBR322 (*ori*): Elemento de replicação e manutenção do plasmídeo em *E.coli*.

Figura 3: Mapa do vetor comercial pET101/D-TOPO para expressão heteróloga em *Escherichia coli*. Representação esquemática do vetor, incluindo o promotor pT7.

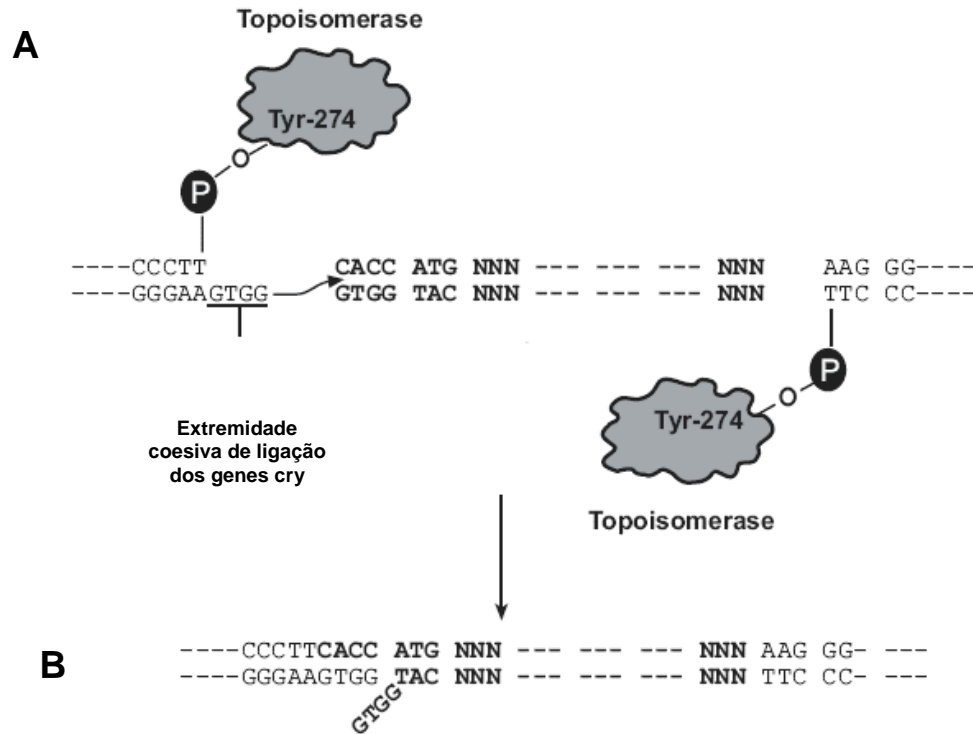


Figura 4: Esquema do sistema de ligação do produto de PCR no vetor de pEt101/D-TOPO. (A) A extremidade coesiva do vetor onde o produto de PCR será clonado é demonstrada juntamente com a presença da enzima topoisomerase. **(B)** O produto de PCR é diretamente clonado pela adição dos 4 pares de bases do oligonucleotídeo de orientação direta. A extremidade coesiva do vetor de clonagem (GTGG) invade a extremidade 5' do produto de PCR, anelando-se com as quatro bases adicionadas (CACC) e estabilizando o produto de PCR na orientação correta. A topoisomerase então cliva o pedaço sobressalente do produto de PCR para que a ligação seja efetiva.

A extração do DNA plasmidial foi realizada como descrito anteriormente no item 5.2.4, assim como a confirmação de clones positivos. Os plasmídeos positivos foram então nomeados de *pET101/cry1Ia12* e *pET101/cry8Ha1*.

5.5.2. Expressão dos genes *cry1Ia12* e *cry8Ha1* em *Escherichia coli*

Plasmídeos gerados no item 5.5.1 (*pET101/cry1Ia12* e *pET101/cry8Ha1*) foram transformados por choque térmico em células de *E. coli* BL21 (DE) Star (Invitrogen). Foram adicionados 10 ng dos vetores *pET101/cry1Ia12* e *pET101/cry8Ha1* em 200 μ L de células competentes e incubou-se a mistura em gelo por 30 min. O choque térmico foi realizado por 3 min a 42 °C e, logo em seguida, a mistura de células foi colocada no gelo. Em seguida, adicionou-se 250 μ L de meio SOC e incubou-se por 30 min a 37 °C e 200 rpm de agitação. Após este período as células foram inoculadas em 10 mL de meio LB-amp e crescidas por 16 h. Esta cultura foi então utilizada com pré-inóculo para a expressão.

Para cada 100 mL de meio LB-amp₁ foram adicionados 5 mL do pré-inóculo. O material foi incubado a 37 °C com 200 rpm de agitação. Após a cultura atingir a DO₆₀₀ entre 0,6-0,8 foi adicionado o indutor (IPTG) na concentração de 1mM e a cultura permaneceu a 37 °C por mais 18 h a fim de se obter a proteína recombinante Cry1Ia12 e 16 h para Cry8Ha1.

Para uma primeira análise em gel de poliácridamida 12%, 1 mL da cultura expressando a proteína recombinante foi centrifugada a 4000 *g* por 10 min. Desprezou-se o sobrenadante e adicionou-se um volume equivalente de tampão de amostra 2 X contendo SDS e β - Mercaptoetanol. O material foi então fervido por 5 min e posteriormente centrifugado. Desse material, 10 μ L foram adicionados em gel de poliácridamida 12%, posteriormente corado com Azul de Comassie. Como controle, foi utilizada uma alíquota retirada antes da indução preparada em iguais condições.

Determinadas às condições de cultura ideais para melhor rendimento da expressão da proteína recombinante, as células foram inoculadas em volumes de 500 mL. Após as 18 h de cultivo, o montante de células foi centrifugado por 10 min a 4.000 *g* e o sobrenadante foi descartado. O precipitado de células foi ressuspensão em 10 ml de tampão de lise (50 mM de tampão fosfato pH 7,8; 300 mM NaCl, 10%

glicerol, 0,5% triton X-100 contendo ou não 2 mg/mL lisozima) e as células foram rompidas por ultra-som (3 X 5 min). O produto lisado foi então centrifugado por 15 min a 10.000 g. O sobrenadante foi então recolhido, quantificado pela metodologia descrita por Lowry *et al.* (1951) e analisado em gel 12% SDS-Page.

Para obtenção de grande quantidade de proteína solúvel, foi preparado meio LB-amp₁ com a adição de dois reagentes: 600 mM sorbitol e 2,5 mM de Betaína. Para expressão, a temperatura ótima utilizada foi 28 °C.

5.5.3. Purificação das toxinas recombinantes Cry1Ia12 e Cry8Ha1 recombinantes

O sobrenadante contendo as proteínas recombinantes foi submetido à cromatografia de afinidade a níquel (Ni), utilizando-se 5 mL da resina Ni-NTA (ácido nitrilotriacético-níquel – Quiagen), com a capacidade de reter 5-10 mg de proteína recombinante com cauda de poli-histidina. A resina foi então empacotada em uma coluna de vidro e equilibrada com 4 volumes de coluna com solução de equilíbrio (50 mM de tampão fosfato pH 7,8; 300mM NaCl e 10 mM imidazol). A amostra foi adicionada (não excedendo a capacidade total da resina) e a porção não retida, reservada e quantificada para análise. O excesso de material foi retirado com a adição de 3 volumes de coluna de tampão de equilíbrio. A lavagem foi realizada com 6 volumes de coluna de solução de lavagem (50 mM de tampão fosfato pH 7,8; 300mM NaCl e 20 mM imidazol). E, finalmente, a proteína foi eluída com dois volumes de coluna de tampão de eluição (50 mM de tampão fosfato pH 7,8; 300mM NaCl e 250 mM imidazol). O material eluído foi então dialisado contra 15 mM tampão carbonato (1,59 g de Na₂CO₃ e 2,93 g de NaHCO₃), quantificado pelo método de Lowry *et al.* (1971) e submetido a bioensaios seletivos para determinação da atividade biológica.

5.6 Bioensaios

5.6.1. Bioensaios com larvas de *Spodoptera frugiperda*

Para determinação da dosagem letal, na qual, 50% das larvas testadas morrem, foram realizados bioensaios com as proteínas recombinantes em diferentes

concentrações previamente determinadas pela metodologia descrita por Lowry *et al.* (1951). As concentrações utilizadas foram 10 ng/cm², 100 ng/cm², 1000 ng/cm² e 5000 ng/cm² de dieta. A concentração total necessária de proteína para o ensaio foi ajustada de modo que 35 µL de cada diluição foram adicionados às placas de cultivo contendo 24 poços com uma área de 2,27 cm² cada um. Após a absorção das proteínas pela dieta as larvas de *S. frugiperda* foram adicionadas uma em cada poço. Como controle negativo, uma placa contendo apenas a dieta foi preparada com as larvas e uma segunda placa contendo o tampão em mesmas condições na qual a amostra se encontrava. As placas foram então fechadas com tampa de acrílico e ligas elásticas foram colocadas para prender bem às mesmas. O experimento foi então colocado em uma B.O.D para aclimatação das larvas. Após 48 h foi feita a primeira leitura e as larvas sobreviventes foram então colocadas em copinhos de plástico de 50 mL contendo dieta livre de proteína por onde as larvas permaneceram por mais quatro dias. Após estes sete dias, foi feita a leitura final de larvas mortas e vivas.

5.6.2. Bioensaios com larvas de *Anthonomus grandis*

O bioensaio contra larvas de *A. grandis* foi realizado em diferentes concentrações da proteína recombinante. As concentrações utilizadas foram 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL. A proteína foi incorporada a 15 mL de dieta e, em seguida, a dieta foi vertida em placas de cultivo contendo 6 poços. Foram adicionados 5 mL em cada poço da placa. Após a solidificação, foram feitos 10 furos sob a mesma onde cada larva neonata foi colocada. O bioensaio foi mantido em câmara de incubação com fotofase de 14 h a uma temperatura de 27 °C. Após uma semana, a leitura de larvas vivas e mortas foi realizada.

6 RESULTADOS

6.1 Caracterização da estirpe S811

6.1.1 Bioensaios preliminares

Bioensaios prévios realizados por Shirley Silva (2002), determinaram a toxicidade da estirpe S811 contra os insetos-praga de importância para a cultura do algodão: *Anthonomus grandis* e *Spodoptera frugiperda*. Foram feitas três repetições de cada bioensaio, utilizando diluições entre 10^{-1} e 10^{-7} mL do conteúdo protéico total (esporos e cristais) da estirpe.

Tabela 2. Sorotipo e toxicidade de estirpes de *B. thuringiensis* contra larvas de *S. frugiperda*, *C. quinquefasciatus* e *A. grandis*. (Silva, 2002).

Estirpe	Sorotipo	Toxicidade (% de mortalidade)		
		<i>S. frugiperda</i> (Lepidópteros)	<i>A. grandis</i> (Coleópteros)	<i>C. quinquefasciatus</i> (Dípteros)
S811	Auto-aglutinante	95	91.6	-
S1265	Morrisori	62	-	-
Btt	Tenebrioni	-	70	-
HD1	Kurstaki	96	-	100

Esses estudos mostraram que 91,6% das larvas de *A. grandis* e 95% das larvas neonatas de *S. frugiperda* foram mortas em bioensaios seletivos com as culturas esporuladas (tabela 2). Esses bioensaios foram realizados na presença das estirpes padrões para coleópteros (Btt) e lepidópteros (HD1), as quais apresentaram taxas de mortalidade de 70% e 96%, respectivamente, indicando alto grau de relevância aos valores encontrados para a estirpe S811.

6.1.2 Caracterização bioquímica da estirpe S811

A fim de conhecer o número e a massa molecular das proteínas-cristal produzidas (figura 5), o extrato protéico total (cristais-esporo) da estirpe S811, obtido conforme item 5.1.2, foi analisado por SDS-PAGE.

Foram observadas duas proteínas majoritárias de aproximadamente 130-140 kDa e 70-80 kDa (figura 5A). Devido à existência de aparentes degradações no extrato protéico, duas extrações distintas foram realizadas: na presença e na ausência de um inibidor de serino-proteinase (PMSF). As frações contendo os extratos obtidos na presença de PMSF podem ser observadas na figura 5, nas linhas 2 e 3, sendo que, na linha 3, o extrato não foi submetido à fervura antes da aplicação em gel. Este procedimento foi realizado com o intuito de analisar o efeito da temperatura na possível degradação das proteínas do extrato, mas neste caso nenhuma alteração foi observada. Quando analisada a amostra na ausência de PMSF (figura 5A, linha 4) observamos o aparecimento de duas outras proteínas de 50 e 20 kDa, aproximadamente (seta vermelha). Esses resultados demonstram que existe, efetivamente, uma proteína de aproximadamente 70-80 kDa, a qual não é gerada a partir da degradação da proteína de maior massa molecular.

Uma segunda análise foi realizada com os cristais purificados por gradiente de sacarose. A figura 5B, representa o perfil protéico dos mesmos, onde pode-se observar a presença das mesmas proteínas majoritárias da figura 5A, de aproximadamente 130-140 kDa e 70-80 kDa. Neste procedimento, os cristais foram solubilizados em tampão contendo ou não PMSF. Na ausência de PMSF novamente foi observada a presença da proteína de menor peso molecular, indicada pela seta vermelha.

A proteína de aproximadamente 130-140 kDa, observada na estirpe S811, é característica de estirpes ativas contra lepidópteros, e é produzida na maioria dos casos pela expressão de genes do grupo *cry1* (Lereclus *et al.*, 1993). Por outro lado, as proteínas de 70-80 kDa são características de estirpes ativas contra lepidópteros, dípteros e, em alguns casos, contra coleópteros (Tailor *et al.*, 1992). O último exemplo ocorre no grupo de toxinas Cry1Ia, as quais possuem massa de 80 kDa e estão relacionadas com atividade contra insetos da ordem Coleoptera (Tailor *et al.*, 1992) e Lepidoptera (Sasaki *et al.*, 1996).

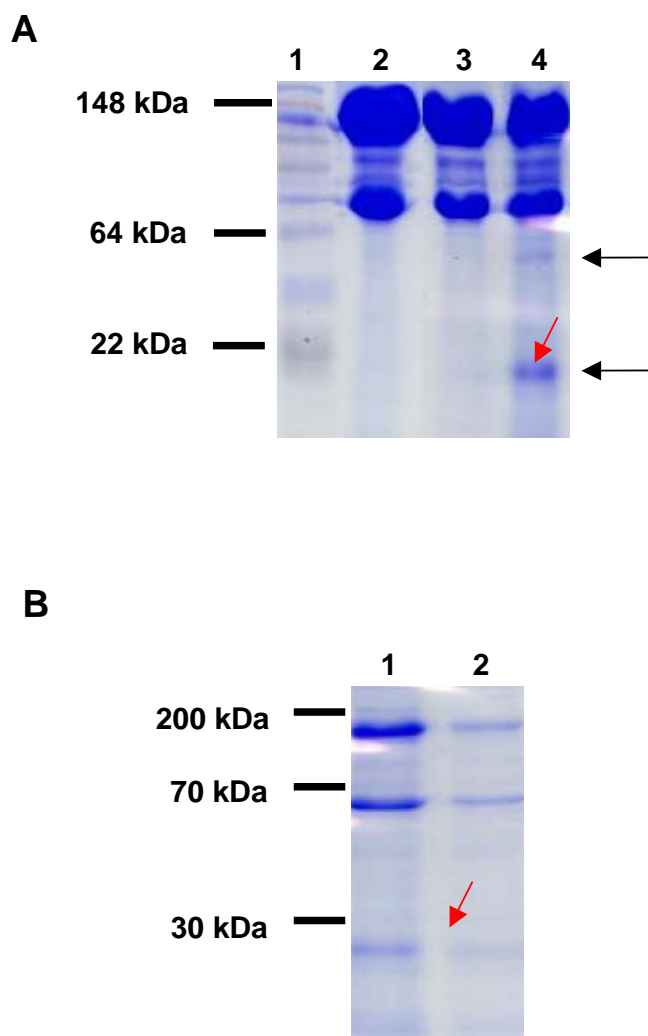


Figura 5: Análise do perfil protéico por SDS-PAGE 12% da estirpe de Bt S811. (A) Extrato total após a esporulação total (72 h). **Linha 1.** Marcador de massa molecular See Blue plus 2 (Invitrogen). **Linha 2.** Extrato total (25 μ g) contendo 1 mM PMSF. **Linha 3.** Extrato total (25 μ g) contendo 1mM PMSF, sem fervura antes da aplicação no gel. **Linha 4.** Extrato total (25 μ g) preparado sem a presença de PMSF. **(B)** Perfil protéico dos cristais purificados segundo De-Souza, *et al.* (1993). **Linha 1.** Cristais solubilizados (15 μ g) em solução tampão sem PMSF. **Linha 2.** Cristais solubilizados (10 μ g) com PMSF. As setas indicam os produtos de degradação. As amostras foram adicionada a tampão de amostra, submetidas a SDS-PAGE 12%, a 25 mA e coradas com azul de Comassie

6.1.3. Caracterização estrutural dos cristais

A identificação parcial de possíveis toxinas Cry presentes em uma estirpe pode ser deduzida a partir da correlação entre toxicidade, composição protéica e os cristais produzidos. A maioria das estirpes de *B. thuringiensis* pode sintetizar mais de um tipo de cristal e cada cristal pode ser formado por diferentes δ -endotoxinas que sejam necessariamente relacionadas.

Neste sentido, os cristais da estirpe S811 foram purificados e analisados por microscopia eletrônica de varredura, onde a presença de cristais bipiramidais e esféricos foi observada (figura 6C e 6D). Por microscopia de contraste de fase observamos a formação do esporo (figura 6B). A análise por microscopia confocal (figura 6A) mostrou a presença majoritária de cristais bipiramidais em meio de cultura, após 72 h de cultivo, e também a presença de alguns esporos, os quais aparecem de forma translúcida.

Cristais de formato bipiramidal foram descritos por Hofte e Whiteley (1989), na estirpe-padrão para lepidópteros BT *kurstaki* HD1. Os autores ainda descrevem nesta estirpe a presença de três tipos de genes codificadores de proteínas-cristal, específicos para lepidópteros: *cry1Aa* e *cry1Ac*, que codificam proteínas de 140 kDa e *cry1Ab* que codifica uma proteína de 130 kDa, as quais se agregam formando estruturas bipiramidais. Os cristais encontrados de formato esférico (figura 6D) podem estar correlacionados com a atividade inseticida contra coleópteros, uma vez que a o padrão Bt para coleópteros possui cristais com o mesmo de formato (Martins *et al.*, 2005). Não obstante, as estirpes Bt866, que expressa a toxina coleóptero-específica Cry3Aa (Herrnstadt *et al.*, 1986), e SDS-502 que expressa a toxina Cry8Da (Asano *et al.*, 2003) também apresentam cristais no formato esférico, sugerindo a presença de genes desta natureza na estirpe S811.

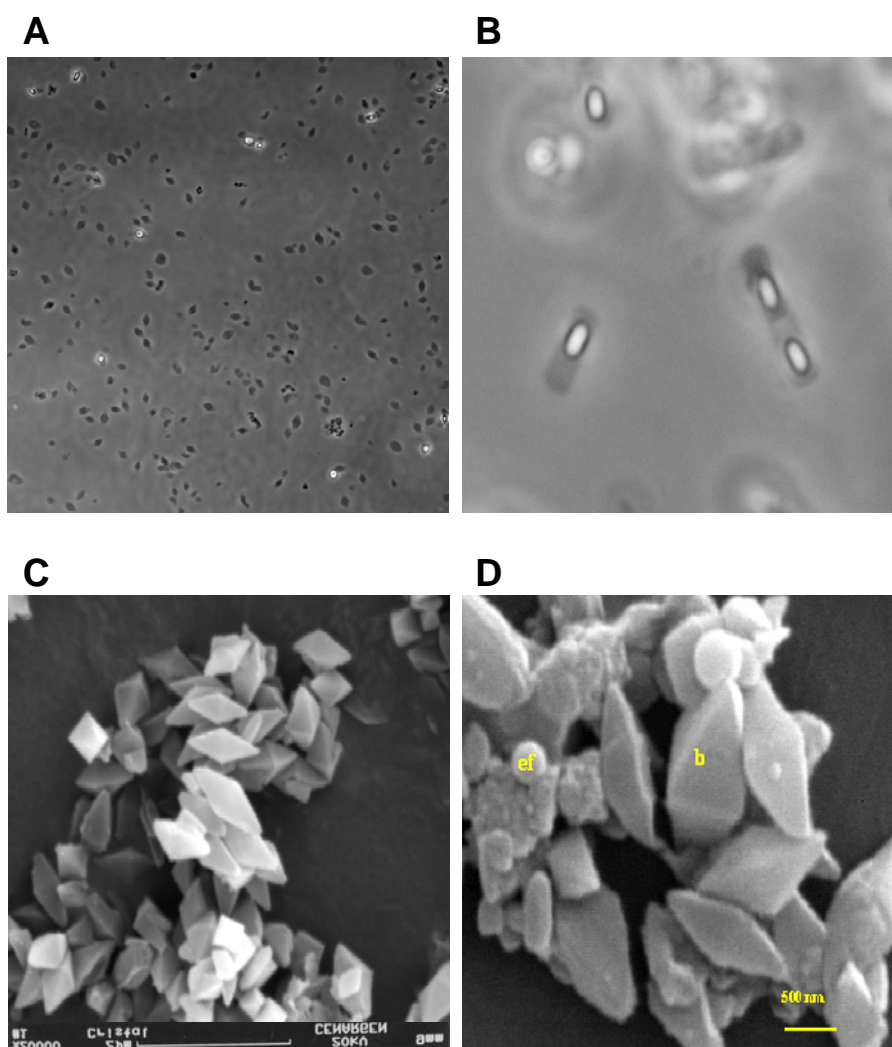


Figura 6: Microscopias confocal, contraste de fase e eletrônica de varredura. (A) Análise da estirpe S811 com cristais e esporos após 72 h de cultivo, amostras coradas com carmim. Os esporos representados pelas estruturas translúcidas e os cristais pelas estruturas escuras. **(B)** Microscopia de contraste de fase demonstrando a estirpe após 30 h de cultivo com os esporos translúcidos ainda dentro da célula e os cristais em formação (1000X). **(C)** Análise por microscopia eletrônica de varredura dos cristais bipiramidais purificados em gradiente de sacarose (20000X). **(D)** Extrato contendo os cristais de formato esférico e bipiramidais (20000X).

6.2. Identificação de genes *cry* e seqüenciamento parcial dos genes

Neste trabalho utilizou-se a técnica de PCR para a amplificação de genes *cry* da estirpe S811. Através desta técnica foram obtidos fragmentos dos tamanhos esperados, utilizando-se DNA total como molde e oligonucleotídeos específicos para a detecção de genes das classes *cry8* e *cry1* (tabela 2). Os resultados mostraram a presença de três fragmentos codificadores de proteínas Cry. Dois são representantes de genes da classe *cry1*, sendo um representante do grupo *cry1Ab* (figuras 7 e 8) e outro *cry1a* (figuras 9 e 10). O terceiro fragmento gênico corresponde a um novo gene do grupo *cry8* (figuras 11 e 12). Os fragmentos foram clonados em *E. coli* XL1-Blue, selecionados e aproximadamente 20 clones de cada fragmento foram seqüenciados. As seqüências nucleotídicas dos fragmentos de DNA obtidas foram comparadas com seqüências dos genes *cry* depositadas no banco de dados GenBank-NCBI, determinando, desta forma, o grupo exato a qual cada fragmento corresponde. O alinhamento múltiplo para geração das seqüências consenso foi feito no programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1994).

6.2.1 Gene *cry1A*

O fragmento gênico *cry1A* foi clonado com os oligonucleotídeos descritos por Bravo *et al.*, 1998. Na figura 7, o fragmento de aproximadamente 300 pb foi obtido em uma primeira reação utilizando DNA total da estirpe S811. Uma segunda reação foi realizada com 1 µL da primeira reação como molde (figura 7B) para obtenção de maior especificidade e quantidade para posterior subclonagem. Quando seqüenciado e analisado pelo programa BLASTn o fragmento foi identificado como sendo correspondente a um gene do grupo *cry1Ab*, apresentando 100% de identidade, como demonstrado pelo alinhamento na figura 8.

Este gene, como descrito anteriormente, codifica proteínas Cry, que se agregam formando cristais bipiramidais, como os presentes na estirpe S811 (figura 6C). Mesmo possuindo alta especificidade para lepidópteros, as toxinas do grupo Cry1Ab, não apresentam toxicidade contra *S. frugiperda*. Por esta razão, sua seqüência completa não foi obtida e outros genes *cry* foram buscados.

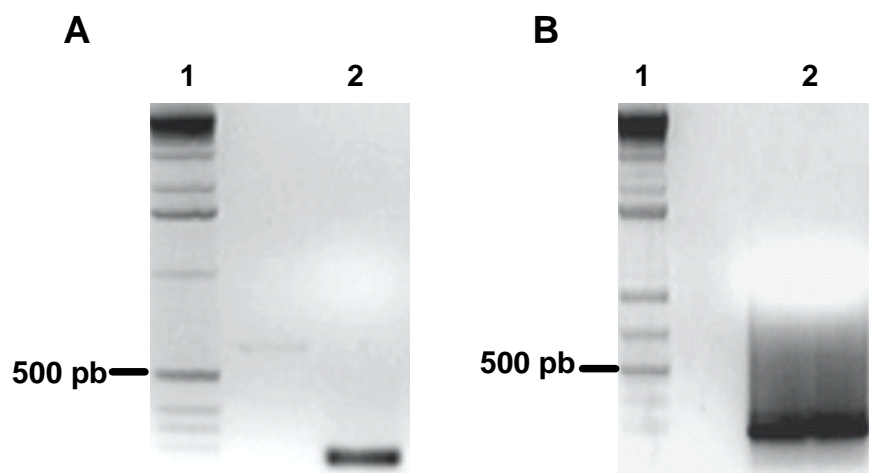


Figura 7: Amplificação do gene *cry1Ab*. Reação de amplificação por PCR, utilizando-se oligonucleotídeos específicos descritos por Cerón *et al.* (1995). Gel de agarose 1,0 % corado com brometo de etídio **(A)** Primeira reação utilizando DNA total da estirpe S811. **Linha 1.** Marcador de peso molecular 1Kb *ladder*. **Linha 2.** Banda específica amplificada de aproximadamente 300 pb. **(B)** Segunda reação utilizando-se 1 μ L da primeira reação (a) como molde. **Linha 1.** Marcador de peso molecular 1Kb *ladder* plus. **Linha 2.** Resultado da amplificação mostrando banda de aproximadamente 300 pb

```

CryIAb      GAGAACAAATACAGACGAACTGAAGTTTAGCAACTGTGTAGAAGAGGAAAGTATATCCAAAC 3204
Cry1Ab-811 -----TGTAGAAGAGGAAAGTCTATCCAAAC 25
Cry1Aa     GAGAACAAATACAGACGAACTGAAGTTTAGCAACTGCGTAGAAGAGGAAATCTATCCAAAT 3286
CryIAc     GAGAACAAATACAGACGAACTGAAGTTTAGCAACTGCGTAGAAGAGGAAATCTATCCAAAT 3210
                ***** * *****

CryIAb      AACACGGTAACGTGTAATGATTATACTGCCGACTCAAGAAGAATA TGAGGGTACGTACACT 3264
Cry1Ab-811 AACACGGTAACGTGTAATGATTATACTGCCGACTCAAGAAGAATA TGAGGGTACGTACAAAT 85
Cry1Aa     AACACGGTAACGTGTAATGATTATACTGTAATCAAGAAGAATACGGAGGTGCGTACACT 3346
CryIAc     AACACGGTAACGTGTAATGATTATACTGTAATCAAGAAGAATACGGAGGTGCGTACACT 3270
                ***** * ***** * *** ***** *

CryIAb      TCTCGTAATCGAGGATATGACGGAGCCTATGAAAGCAATTCTTCTGTACCAGCTGATTAT 3324
Cry1Ab-811 TCTCGTAATCGAGGATATGACGGAGCCTATGAAAGCAATTCTTCTGTACCAGCTGATTAT 145
Cry1Aa     TCTCGTAATCGAGGATATAACGAAGC-----TCCTCCGTACCAGCTGATTAT 3394
CryIAc     TCTCGTAATCGAGGATATAACGAAGC-----TCCTCCGTACCAGCTGATTAT 3318
                ***** *** *** * **** *****

CryIAb      GCATCAGCCTATGAAGAAAAAGCATATACAGATGGACGAAGAGACAATCCTTGTAATCT 3384
Cry1Ab-811 GCATCAGCCTATGAAGAAAAAGCATATACAGATGGACGAAGAGACAATCCTTGTAATCT 205
Cry1Aa     GCGTCAGTCTATGAAGAAAAATCGTATACAGATGGACGAAGAGAGAAATCCTTGTAATTT 3454
CryIAc     GCGTCAGTCTATGAAGAAAAATCGTATACAGATGGACGAAGAGAGAAATCCTTGTAATTT 3378
                ** **** ***** * ***** *****

CryIAb      AACAGAGGATATGGGGATTACACACCCTACCAGCTGGCTATGTGACAAAAGAATTAGAG 3444
Cry1Ab-811 AACAGAGGATATGGGGATTACACACCCTACCAGCTGGCTATGTGACAAAAGAATTAGAG 265
Cry1Aa     AACAGAGGATATAGGGATTACACGCCCTACCAGTGGTTATGTGACAAAAGAATTAGAA 3514
CryIAc     AACAGAGGATATAGGGATTACACGCCCTACCAGTGGTTATGTGACAAAAGAATTAGAA 3438
                ***** ** ***** ***** ** *****

CryIAb      TACTTCCCAGAAACCGATAAGGTATGGATTGAGATCGGAGAAACGGAAGGAACATTTCATC 3504
Cry1Ab-811 TACTTCCCAGAAACCGATA----- 284
Cry1Aa     TACTTCCCAGAAACCGATAAGGTATGGATTGAGATTGGAGAAACGGAAGGAACATTTCATC 3574
CryIAc     TACTTCCCAGAAACCGATAAGGTATGGATTGAGATTGGAGAAACGGAAGGAACATTTCATC 3498
                *****

```

Figura 8: Alinhamento múltiplo de seqüências *cry1* do banco de dados com o fragmento gênico clonado *cry1Ab* utilizando ClustalW 2.0. Fragmento de aproximadamente 284 pb. (*cry1gral*, Céron *et al.*, 1995)

6.2.2 Gene *cry1I*

Os oligonucleotídeos, descritos por Cerón *et al.* (1995), permitiram a amplificação de outro gene *cry1*, pertencente ao grupo *cry1Ia*. Na figura 9, o fragmento de aproximadamente 250 pb foi obtido em uma primeira reação utilizando DNA total da estirpe S811. Nesta primeira rodada, pode-se observar que a amplificação, apesar de específica, não foi intensa (figura 9A), o que pode ser resolvido quando se procedeu à segunda reação, com 1 µL da primeira reação como molde (figura 9B) e obtendo-se maior quantidade para posterior subclonagem e análises. Quando seqüenciado e analisado pelo programa BLASTn o fragmento amplificado foi identificado como um gene *cry1Ia*, com 99% de identidade, como demonstrado pelo alinhamento na figura 10.

Genes pertencentes a este grupo possuem atividade descrita contra insetos da ordem Coleoptera (Tailor *et al.*, 1992) e, por esta razão, sua seqüência completa foi amplificada, clonada, expressa e a proteína recombinante produzida foi testada em bioensaios seletivos.

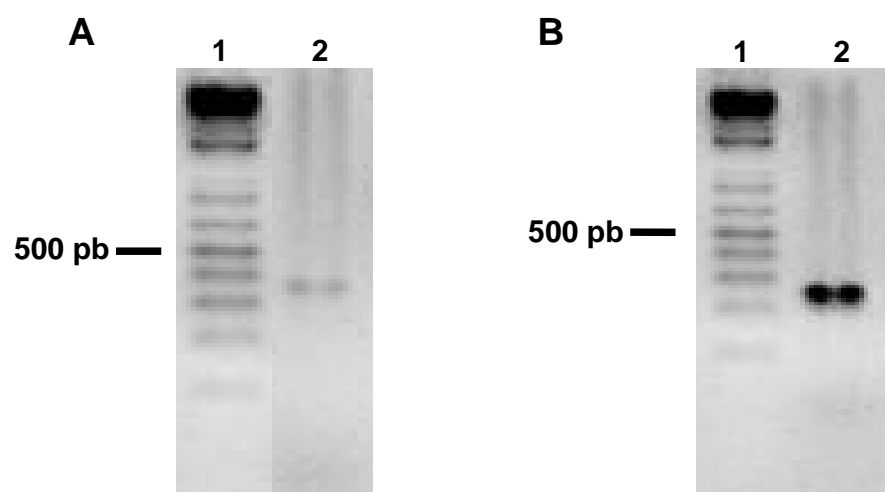


Figura 9: Amplificação do gene *cry1I*. Reação de amplificação por PCR, utilizando-se oligonucleotídeos específicos descritos por Bravo *et al* (1998). Gel de agarose 0,8 % corado com brometo de etídio. **(A)** Primeira reação utilizando DNA total da estirpe S811. **Linha 1.** Marcador de massa molecular 1Kb *ladder*. **Linha 2.** Banda específica amplificada de aproximadamente 350 pb. **(B)** Segunda reação utilizando-se 1 μ L da primeira reação (a) como molde. **Linha 1.** Marcador de massa molecular 1Kb *ladder*. **Linha 2.** Resultado da amplificação mostrando banda de aproximadamente 350 pb.

```

Cry11      TTTTAACTCAACCTGTTAATGGAGTACCTAGGGTTGATTTTCATTGGAA 1555
Cry1159    TTTTAACTCAACCTGTTAATGGAGTACCTAGGGTTGATTTTCATTGGAA 1800
Cry1101    TTTTAACTCAACCTGTTAATGGAGTACCTAGGGTTGATTTTCATTGGAA 1277
cry1 811   TTTTAACTCAACCTGTTAATGGAGTACCTAGGGTTGATTTTCATTGGAA 238
          *****

cry11      ATTCGTCACACATCCGATCGCATCTGATAATTTCTATTATCCAGGGTATG 1605
cry1159    ATTCGTCACACATCCGATCGCATCTGATAATTTCTATTATCCAGGGTATG 1850
cry1101    ATTCGTCACACATCCGATCGCATCTGATAATTTCTATTATCCAGGGTATG 1327
cry1 811   ATTCGTCACACATCCGATCGCATCTGATAATTTCTATTATCCAGGGTATG 288
          *****

cry11      CTGGAATTGGGACGCAATTACAGGATTCAGAAAATGAATTAACCACCTGAA 1655
cry1159    CTGGAATTGGGACGCAATTACAGGATTCAGAAAATGAATTAACCACCTGAA 1900
cry1101    CTGGAATTGGGACGCAATTACAGGATTCAGAAAATGAATTAACCACCTGAA 1377
cry1V 811  CTGGAATTGGGACGCAATTACAGGATTCAGAAAATGAATTAACCACCTGAA 338
          *****

cry11      GCAACAGGACAGCC-AAATTATGAATCTTATAGTCATAGATTATCTCATA 1704
cry1159    GCAACAGGACAGCC-AAATTATGAATCTTATAGTCATAGATTATCTCATA 1949
cry1101    GCAACAGGACAGCC-AAATTATGAATCTTATAGTCATAGATTATCTCATA 1426
cry1V 811  GCAACAGAACGACCCAAATATG----- 361
          ***** ** ** *****

```

Figura 10: Alinhamento múltiplo de seqüências *cry1I* do banco de dados com o fragmento gênico clonado *cry1I* utilizando ClustalW 2.0. Fragmento de aproximadamente 361 pb. (*cry1gral*, Céron *et al.*, 1995)

6.2.3 Gene *cry8*

O fragmento gênico *cry8* foi clonado utilizando os oligonucleotídeos descritos por Bravo *et al.* (1998), específicos para o grupo de proteína para insetos da ordem Coleoptera. Na figura 11A, o fragmento de aproximadamente 450 pb foi obtido em uma primeira reação utilizando DNA total da estirpe S811. Na primeira rodada de amplificação, não foi possível obter uma banda tão específica como nos casos anteriores. Por esta razão, este fragmento foi removido do gel de agarose e eluído, servindo como molde para a segunda reação, a qual resultou em duas bandas diferenciadas (figura 11B, linha 2). Ambas foram clonadas e seqüenciadas e apenas a de maior tamanho correspondeu a um gene *cry*.

Quando analisada a seqüência nucleotídica deste fragmento de DNA com outras seqüências de outros genes *cry* depositadas no banco de dados Genbank – NCBI, observou-se que o mesmo correspondia a um novo gene do grupo das toxinas Cry8, apresentando 58% de identidade com a toxina Cry8Aa (dados não apresentados). Confirmando, desta forma, que este fragmento correspondia a um gene diferenciado dos demais presentes na literatura.

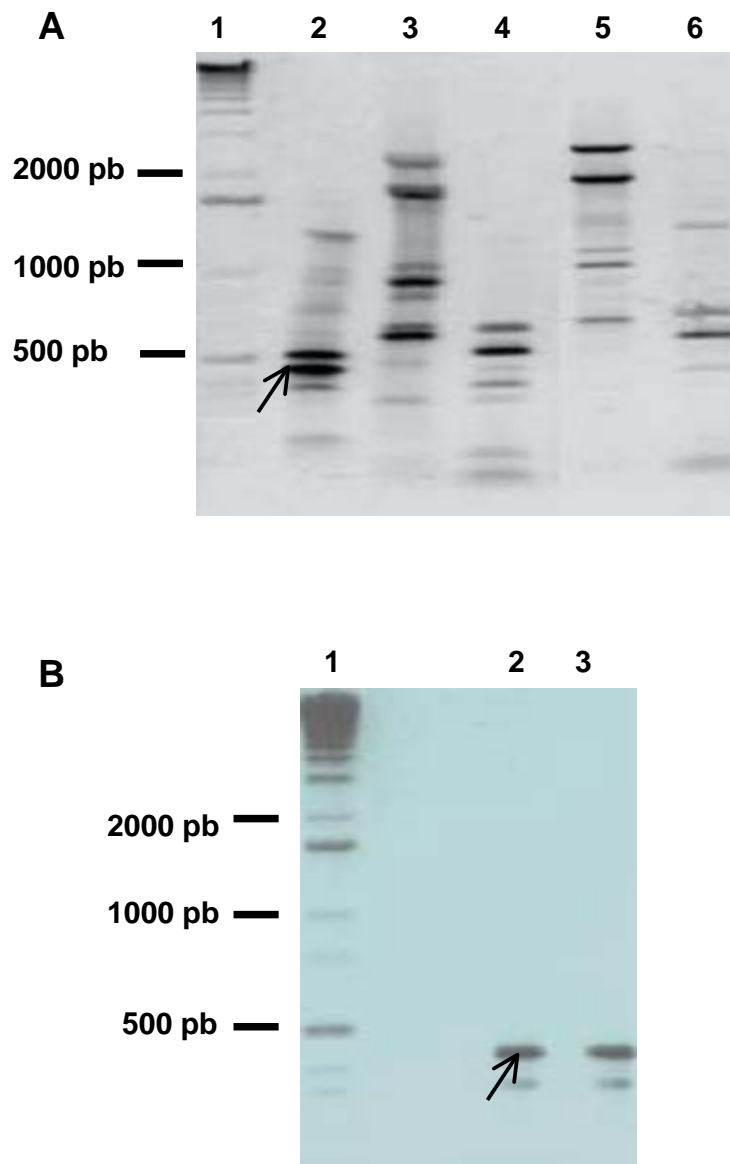


Figura 11: Amplificação do gene *cry8*. Reação de amplificação por PCR, utilizando-se oligonucleotídeos específicos descritos por Bravo *et al* (1998). Gel de agarose 1,0% corado com brometo de etídio **(A)** Primeira rodada com os oligonucleotídeos descritos por Bravo *et al* (1998). **Linha 1.** Marcador de peso molecular 1 Kb ladder plus. **Linha 2.** Bandas amplificadas de aproximadamente 400 pb com o oligonucleotídeos *cry8b*, 2a. rodada. A seta indica o produto provável desejado. **Linha 3.** Oligonucleotídeos *cry8a*, 2a. rodada. **Linha 4.** Oligonucleotídeos *cry8geral*. **Linha 5.** Oligonucleotídeos *cry8a*, 1a. Rodada. **Linha 6.** Oligonucleotídeos *cry8geral*, 1a. Rodada. **(B)** Segunda rodada com o oligonucleotídeo *cry8b* **Linha 1.** Marcador de peso molecular 1 Kb ladder plus. **Linha 2 e 3.** Amplificação utilizando 1 μ L da reação 1 (figura A) e amostra da linha 2 com a banda de aproximadamente 450

6.3. Isolamento e clonagem do gene *cry8*

Posteriormente à identificação do novo gene *cry8*, oligonucleotídeos específicos ao fragmento de 442 pb foram desenhados para clonagem do gene completo pela técnica de TAIL-PCR (figura 2) utilizando-se DNA total da estirpe em fase vegetativa. Essa técnica foi realizada em duas etapas (figura 2), onde ambas amplificaram fragmentos de aproximadamente 1000 nucleotídeos, gerando um produto final de aproximadamente 2600 pb.

A partir da seqüência proveniente da identificação de genes *cry*, três oligonucleotídeos foram desenhados na orientação “sense”, específicos para o fragmento gênico clonado. Estes oligonucleotídeos foram utilizados para obter a extremidade 3’ do gene de *cry8*, em conjuntos com os oligonucleotídeos degenerados AD1, AD2, AD3, AD4, AD5, AD10, AD11 e W4. Desta forma, oito reações de PCR foram realizadas em três rodadas distintas, onde a segunda e a terceira utilizavam como molde a etapa anterior. Estes oligonucleotídeos específicos foram desenhados com um espaçamento representativo no gene de aproximadamente 50-100 pb, o que permitiu a visualização de ampliações seqüenciais de 100 pb de diferença entre bandas das primeiras, segundas e terceiras rodadas.

Fragmentos com o tamanho desejado foram encontrados nas ampliações que utilizaram AD3 e AD11 (figura 12 A e B). Ambos os fragmentos foram clonados e seqüenciados para subsequente análise. Apenas o fragmento obtido pela amplificação com AD11 foi positivo. Obtida esta segunda parte da seqüência do gene *cry8*, uma segunda rodada de TAIL-PCR foi realizada com outros três oligonucleotídeos específicos, desenhados também na orientação “sense”, com espaçamento de 50-100 pb entre eles e foram usados em conjunto com os oligonucleotídeos degenerados AD1, AD2, AD3, AD4, AD5, AD10, AD11 e W4. Neste caso, apenas quatro conjuntos de oligonucleotídeos produziram reações de PCR com ampliações sendo que apenas a amplificação com AD2 gerou o perfil desejado. Este fragmento foi então clonado e seqüenciado, gerando um produto final de aproximadamente 1000 nucleotídeos (figura 12C).

Para obter a seqüência completa do gene, os clones foram seqüenciados pelas extremidades com oligonucleotídeos gerais e, dentro do gene, com oligonucleotídeos específicos. Todas as seqüências obtidas foram alinhadas para determinação do consenso (figura 13), resultando na seqüência nucleotídica e na seqüência protéica predita do gene, então nomeado de *cry8Ha1*, segundo as normas estabelecidas por (Crickmore *et al.*, 1998). Esta seqüência gerou informação para o desenho de oligonucleotídeos específicos para amplificação da porção do gene total e este foi, subseqüentemente, clonado no vetor pGEMT-easy, gerando o plasmídeo *pGEMT-easy/cry8Ha1*.

Quando submetida ao Genbank e SwissProt pelo BLASTp, *cry8Ha1* alinha com as demais toxinas Cry do banco de dados (figura 18), principalmente com as seqüências já existentes de Cry8, com valores de similaridade e identidade de 58% e 73%, respectivamente (figura 14). A seqüência protéica predita da nova toxina Cry8 apresentou os três domínios estruturais característicos das δ -endotoxinas, além de 240 aminoácidos da extensão C-terminal. A comparação com outras proteínas da família Cry8 demonstrou que cerca de 260 aminoácidos estão faltando na extremidade C-terminal. Interessante notar que quando comparada com as demais toxinas Cry8 (Cry8Aa, Cry8Ba, Cry8Bb1, Cry8Bc1, Cry8Ca1, Cry8Ca2 e Cry8Da) a porção inicial do N-terminal de Cry8Ha1 foi a única que apresentou substituições nos resíduos S² por R, Q⁶ por L, E⁸ por A, Y⁹ por D e I¹² por L.

Dentre todas as Cry8 descritas, Cry8Ha1 possui maior homologia com a toxina Cry8Aa e menor com a toxina Cry8Da1, a qual forma um grupo isolado (figura 14). A região da proteína compreendida entre os resíduos de aminoácidos 310 e 521, ou seja, grande parte do domínio II, é a que apresenta maiores divergências de seqüências, sendo bastante diversificada entre todas as toxinas Cry8. Alguns blocos conservados podem ser observados ao longo da seqüência na região compreendida entre os resíduos de aminoácidos 523 e 550. A extremidade C-terminal (resíduos 910 a 1131) apresenta alta identidade com as demais proteínas Cry8.

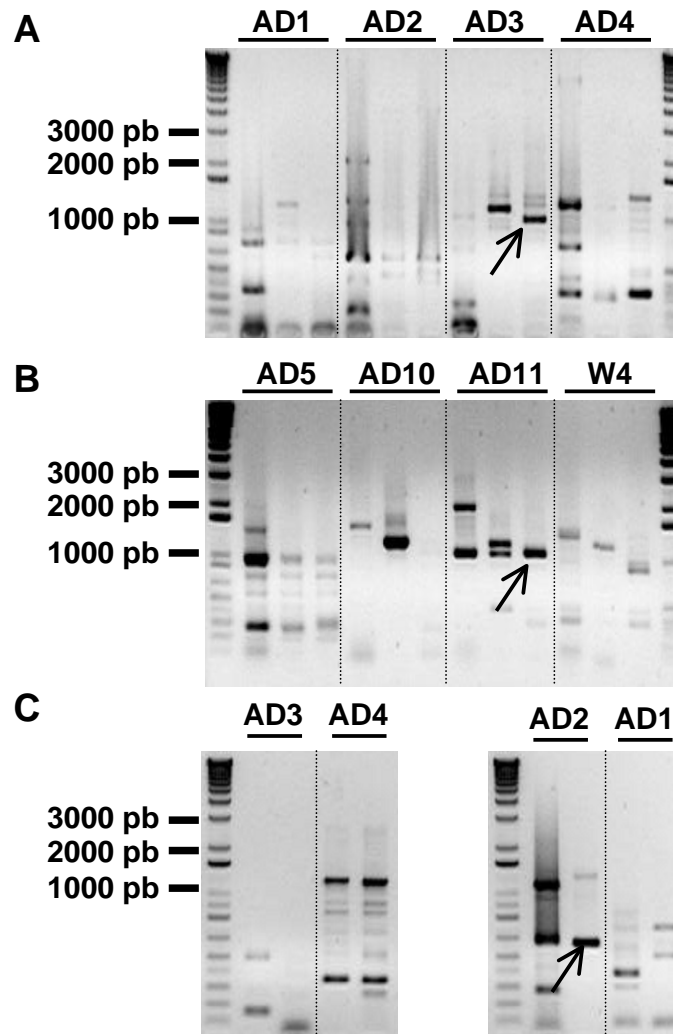


Figura 12: Clonagem do gene *cry8* da estirpe S811 por TAIL-PCR. Géis de agarose 1,0% corados com brometo de etídio e marcador de peso molecular 1 Kb ladder plus. **(A)** Primeiro TAIL-PCR utilizando-se os oligonucleotídeos arbitrários AD1, AD2, AD3, AD4, mostrando as sucessivas rodadas de ampliações com cada oligonucleotídeos específico. **(B)** Primeiro TAIL-PCR utilizando-se os oligonucleotídeos arbitrários AD5, AD10, AD11, W4, mostrando as sucessivas rodadas de ampliações com cada oligonucleotídeos específico. **(C)** Segundo TAIL-PCR utilizando-se os oligonucleotídeos arbitrários AD3, AD4, AD2 e AD1, mostrando as sucessivas rodadas de ampliações com cada oligo específico. As setas indicam os produtos potencialmente positivos que foram subsequentemente clonados e

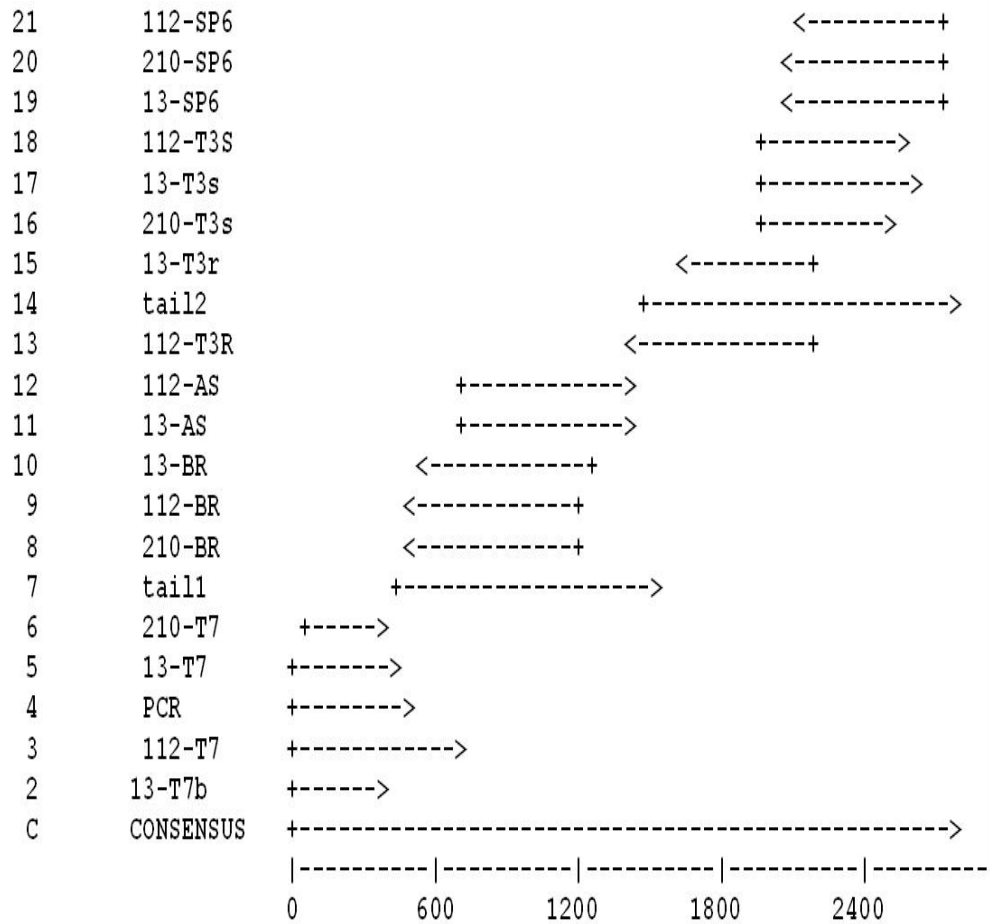


Figura 13: Representação esquemática do consenso do gene *cry8Ha1*. O fragmento do primeiro PCR e das duas rodadas de TAIL-PCR seqüenciados com diversos oligonucleotídeos gerais e específicos. A sobreposição dessas seqüências nucleotídicas forneceu um consenso correspondente a seqüência gênica completa.

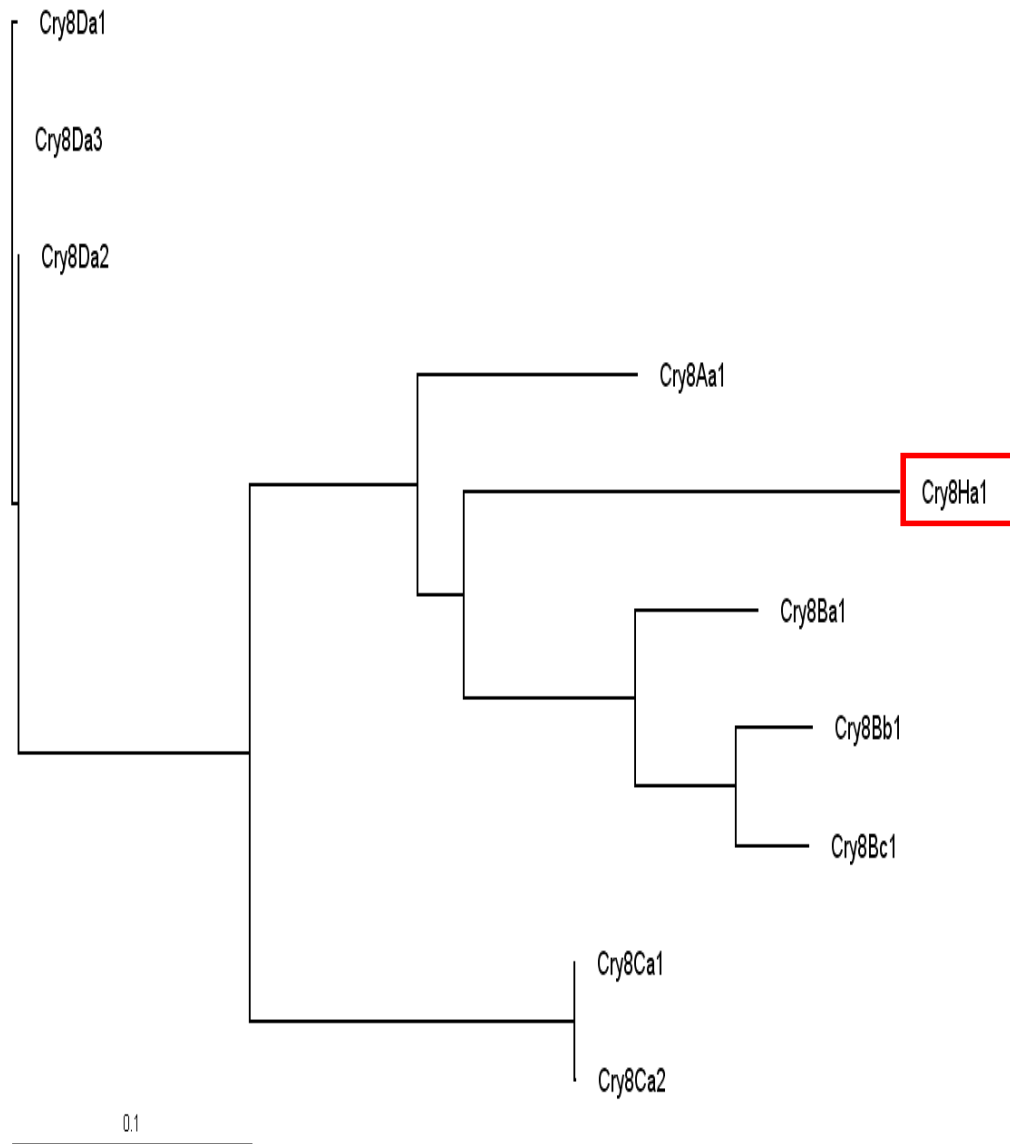


Figura 14: Dendograma do alinhamento da nova toxina Cry8Ha1, obtido após as duas rodadas de TAIL-PCR. Análise com as demais toxinas Cry8 depositadas no banco de dados até o momento, mostrando a alta identidade entre elas e que o gene clonado codifica uma proteína distinta das demais. A escala indica que no espaço representado existe a troca de 0,1 aa

6.4. Isolamento e clonagem do gene *cry1I*

A obtenção do gene completo *cry1I* foi realizada por PCR, utilizando oligonucleotídeos específicos desenhados a partir de regiões conservadas dessa classe de proteínas Cry. A partir de DNA total da estirpe obteve-se uma amplificação com produto de tamanho esperado de 2200 pb (figura 15), o qual foi clonado no vetor pGEMT-easy, gerando o plasmídeo *pGEMT-easy/cry1Ia12*. Após seqüenciamento, as análises de seqüência revelaram que o fragmento possui alta similaridade com outros genes *cry1Ia* descritos por Taylor *et al.*, (1992). A seqüência final foi nomeada *cry1Ia12*, segundo as normas estabelecidas pelo comitê de nomenclatura de Bt (Crickmore *et al.*, 1998). O gene *cry1Ia12* possui 2160 pb e codifica uma proteína predita de 719 aminoácidos (figura 16) com pl teórico de 6,21. A análise de homologia com outras 10 toxinas do tipo Cry1I usando o programa BLAST indica que a seqüência protéica Cry1Ia12 possui 99% de identidade com Cry1Ia1, Cry1Ia2, Cry1Ia3, Cry1Ia4, Cry1Ia5, Cry1Ia6, Cry1Ia8, Cry1Ia10 e Cry1Ia11, enquanto a identidade com Cry1Ia7 foi de 95%. Quando comparada com outras toxinas Cry1I a identidade foi de 93% com Cry1Ie1, 92% com Cry1Ib1 e 89% com Cry1Ic1, Cry1Ic2 e Cry1Id1. Os cinco blocos conservados de toxinas Cry estão presentes na toxina Cry1Ia12, assim como a presença dos três domínios estruturais (figura 16).

Quando comparado com os demais genes, *cry1Ia12* possui substituições nas posições 476 de A por G e 1719 de C por T, resultando em uma única substituição de Lys¹⁵⁹ por Arg no domínio I (localizada na segunda alfa-hélice). Uma mesma modificação na mesma posição ocorre com *cry1Ia5*. Quando comparada com *cry1Ia1* (Taylor *et al.*, 1992) e *cry1Ia3* (Shin *et al.*, 1995) existem substituições nas posições 697 de T por G, resultando em uma substituição de Tyr²³³ por Asp (domínio I). Comparado com os genes *cry1Ia3*, *cry1Ia11* (Tousin *et al.*, 2003) e *cry1Ia5* foram observadas substituições nas posições 2133 de C por G e na posição 2134 de G por C, gerando a modificação de Asn⁷¹¹ por Lys e Glu⁷¹² por Gln, respectivamente (ambas no domínio III).

A toxina Cry1Ia7, considerada uma exceção do grupo, apresenta-se como a mais distinta das demais, diferindo de Cry1Ia12 em 28 resíduos aminoácidos, localizados, em sua grande parte, no domínio II.

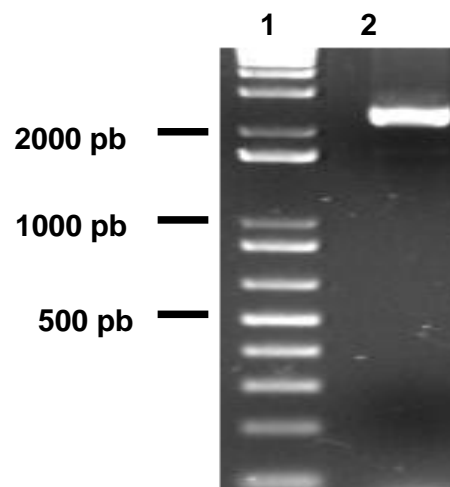


Figura 15: Amplificação do gene *cry1I*. Reação de PCR, gel de agarose 1,0 % corado com brometo de etídio. **Linha 1.** Marcador de peso molecular 1Kb ladder plus. **Linha 2.** Produto da amplificação de 2100 pb utilizando-se oligonucleotídeos específicos para as seqüências de *cry1*, pré-existentes no banco de dados. A amplificação foi realizada em uma única rodada de PCR gerando o produto altamente específico, o qual foi clonado e seqüenciado para determinação da seqüência.

```

atgaaactaaagaatcaagataaagcatcaaaagtctttctagcaaatgcaaaagttagataaaatctctacggattcactaaaa
M K L K N Q D K H Q S F S S N A K U D K I S T D S L K
aatgaaacagatatagaattacaaaacattaatcatgaagattgtttgaaaatgtctgagtatgaaaatgtagagccggtt
N E T D I E L Q N I N H E D C L K M S E Y E M V E P F
gttagtgcatcaacaattcaaacaggtattgggtattgcggtgaaaatacttggtaccctaggcggtccttttgcaggacaa
V S A S T I Q T G I G I A G K I L G T L G V P F A G Q
gtagctagctctttatagttttatcttagtgtagctatggcctaaggggaaaaatcaatgggaaatctttatggaacatgta
V A S L Y S F I L G E L W P K G K N Q W E I F H E H V
gaagagattataatcaaaaatatacaactatgcaagaataaagcacttacagacttgaaggattaggagatgcctta
E E I I N Q K I S T Y A R N K A L T D L K G L G D A L
gctgtctaccatgattcgttgaaggtgggtggaaatcgtaataacacaagggctaggagtgtgtcaggagccaat
A V Y H D S L E S W V G N R N N T R A R S V V R S Q Y
atcgcatagaattgatgttcgttcagaaactaccttcttttgcagtgtctggagaggaggtaccattataccgatata
I A L E L H F V Q K L P S F A V S G E E V P L L P I Y
gcccaagctgcaaaattacatttgttctatgaagagatgcattctatcttttggaaaagagtgaggattatcatcttcagaa
A Q A A N L H L L L L R D A S I F G K E W G L S S S E
atctcaacattttataaccgtcaagtcgaacgagcaggagattattccgaccattgtgtgaaatggatagcaggtcta
I S T F Y N R Q V E R A G D Y S D H C V K W Y S T G L
aataacttgaggggtacaatgcaaaagtgggtacgatataatcaattccgttagagacatgactttatggtagtagat
N N L R G T N A E S W V R Y N Q F R R D H T L H V L D
ttagtgactatctcaagctatgatcacaaaatgtatccaattaaaactacagcccaacttacaagagaagtatataca
L V A L E P S Y D T Q M Y P I K T T A Q L T R E V Y T
gacgcaattgggacagtacatccgcatccaagttttacaagtagcacttgggtataataataatgcaacctcgttctctgcc
D A I G T V H P H P S F T S T T W Y N N N A P S F S A
atagaggctgctgttctgcaaaaccgcatctactcgattttctagaacaagttacaatttaccagcttataagtcgatgg
I E A A V V R N P H L L A D F L E Q V T I Y S L L S R W
agtaaacactcagtatataatgtggggaggacataaaactagaattccgaacaataggaggaacgtaaatatctcaaca
S N T Q Y H N H W G G H K L E F R T I G G T L N I S T
caaggatctactaatctctatataatcctgtaacattaccgttcacttctcagagactctataggactgaatcattggca
Q G S T N T S I N P V T L P F T S R D V Y R T E S L A
gggtgaatctatcttttaactcaactctgtaaatggagtagcactagggtgattttcattggaaatcgtcacacatccgac
G L N L E L T Q P V M G V P R V D F H W K E V T H P I
gcactctgataatctctatctcagggtatgctggaattgggacgcaattacaggatccagaaaatgaattaccacctgaa
A S D N F Y Y P G Y A G I G T Q L Q D S E N E L P P E
gcaacaggacagccaaatataatcttatagtcataagattatctcatataggactcatttcagcatcacatgtgaaagca
A T G Q P N Y E S Y S H R L S H I G L I S A S H V K A
ttggatattcttggagcgcagtagtgagatcgtaacaatacaattgagccaaatagcattacacaataccattagta
L V Y S W T H R S A D R T N T I E P N S I T Q I P L V
aaagctttcaatctgtcttcaggtgcccgtgtagtgagagaccaggatttacagggtgggatatcccttcgaagaacgaat
K A F N L S S G A A V V R G P G F T G G D I L R R T N
actggtacatttgggatatacagagtaaatatcaatccaccatttgcacaaagatatacgcgtgaggtatcgtatgcttct
T G T F G D I R V N I N P P F A Q R Y R V R I R Y A S
accacagatttacaatttcatagtcgaattaacggtaaaagctatataatcaaggtaattttcagcaactatgaatagagga
T T D L Q F H T S I N G K A I N Q G N F S A T H N R G
gaggacttagactataaaaacttttagaactgtaggctttaccactccatttagctttttatagatgtacaaaagcattcaca
E D L D Y K T F R T V G F T T P F S F L D V Q S T F T
atagggtgcttggaaacttctctcaggtaacgaagtttatatagatagaattgaatttgttccggtagaagtaacatagag
I G A W N F S S G N E V Y I D R I E F V P V E V T Y E
gcagaatgatgtttgaaaaagcgaagagaaggttactgcactgtttacatctacgaatccaagaggattaaaaacagat
A E Y D F E K A Q E K V T A L F T S T N P R G L K T D
gtaaaaggattatcatattgaccaggtatcaaaatttagtagagttctctatcagatgaattctatcttgatgaaaagagaaa
V K D Y H I D Q V S N L V E S L S D E F Y L D E K R E
ttattcgagatagttaaaatcgcgaagcaactccatattgagcgtaacatgtag
L F E I V K Y A K Q L H I E R N M -

```

Figura 16: Sequência completa do gene *cry1la12*. Esta sequência encontra-se deposita no Genbank, número de acesso AY788868. As marcações em cinza indicam os três domínios estruturais da proteína Cry1la12 deduzida a partir da sequência nucleotídica.

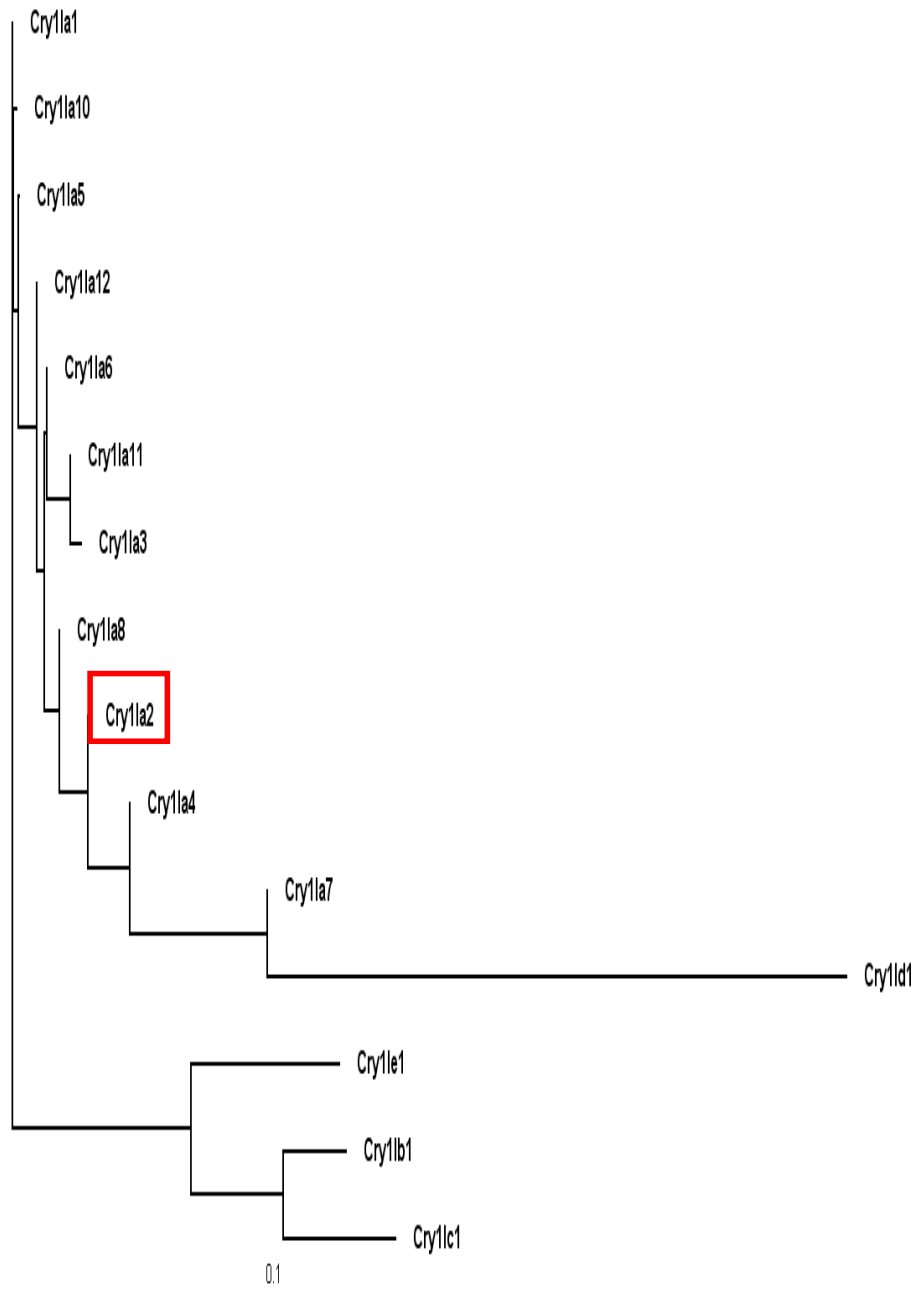


Figura 17: Dendrograma do alinhamento da toxina Cry1a12. Análise da toxina Cry1a12 com as demais toxinas Cry1I depositadas no banco de dados até o momento, mostrando a alta identidade (99%) e sua alta similaridade(99%) com as demais. A escala indica que no espaço representado existe a troca de 0,1 aa demonstrando que as seqüências do tipo Cry1a pouco diferem entre si e divergem em poucos pontos das toxinas Cry1b, Cry1c, Cry1d e Cry1e.

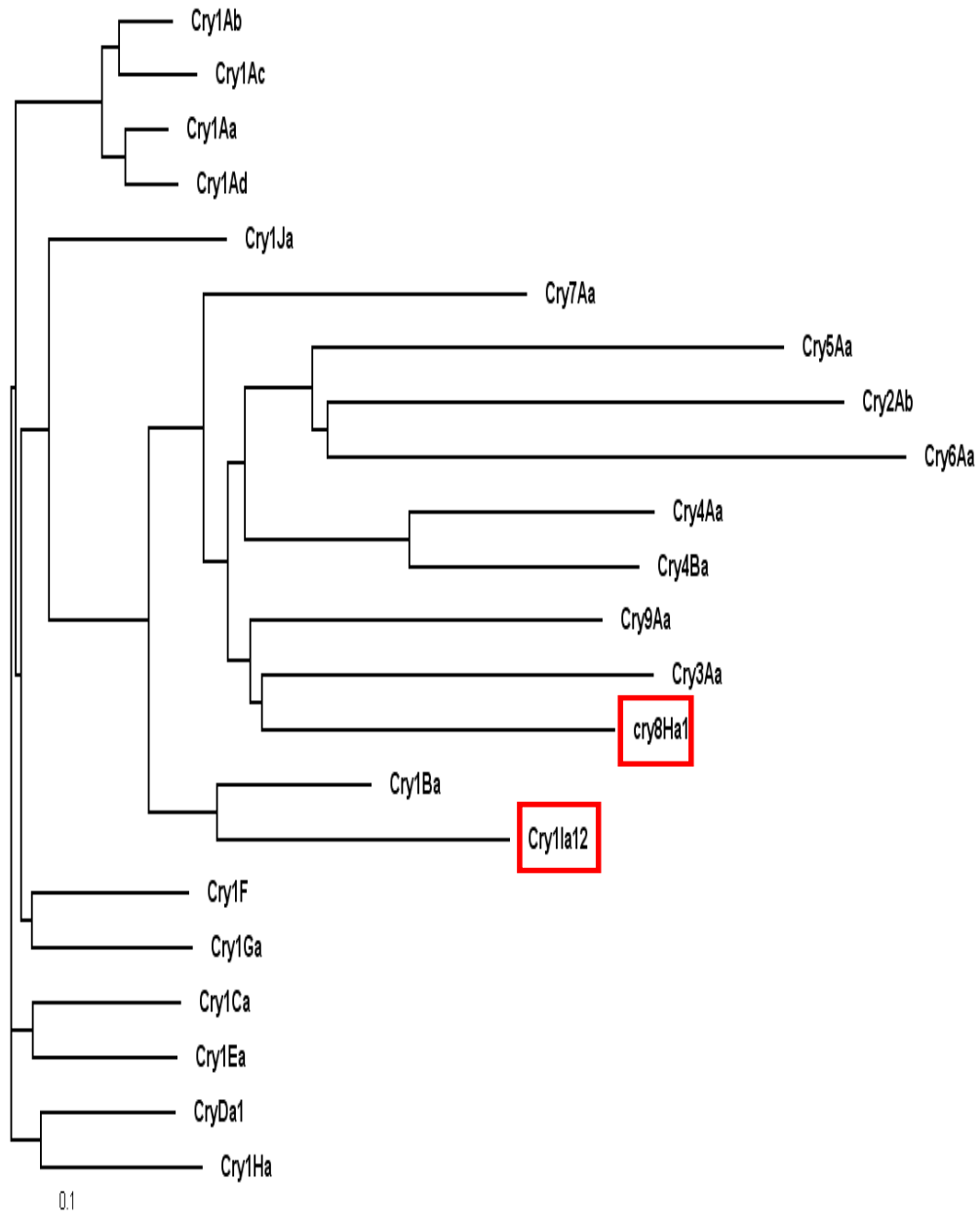


Figura 18: Dendrograma do alinhamento das toxinas Cry1Ia12 e Cry8Ha1 com outras presentes no banco de dados. A escala indica que no espaço representado existe a troca de 0,1 aa demonstrando que as seqüências diferenciam-se bastante entre si formando grupos bem conservados. Podemos observar também que Cry1I difere-se bastante das demais toxinas, formando um grupo isolado juntamente com Cry1Ba.

6.5. Obtenção das toxinas recombinantes Cry1Ia12 e Cry8Ha1

6.5.1 Amplificação dos genes *cry1Ia12* e *cry8Ha1* e construção dos vetores de expressão.

Após a obtenção dos vetores contendo os genes de interesse, os mesmos foram submetidos a análises de suas seqüências para o desenho de oligonucleotídeos na região correspondente aos três domínios estruturais. Numa primeira rodada de amplificação por PCR, utilizando como molde os vetores *pGEMT-easy/cry8* e *pGEMT-easy/cry1I* e os oligonucleotídeos específicos, foram obtidos fragmentos únicos, no tamanho esperado. A reação foi realizada para obtenção de uma quantidade suficiente de material para posterior purificação. Este material foi, então, utilizado na construção dos vetores de expressão *pET101/cry1Ia12* e *pET101/cry8Ha1*. Estes vetores foram transformados nas células competentes de *E. coli* TOP10 para seleção de clones positivos. As células transformadas foram semeadas em meio LBagar-amp e as colônias que cresceram no meio seletivo foram submetidas a uma análise de PCR (PCR de colônia), com o intuito de descartar qualquer contaminação ou clones não transformados. Ao final da análise, observou-se que todos os clones eram positivos, o que confirmou a alta eficiência de transformação destas células. Cinco clones positivos foram inoculados em meio LB-amp para a purificação dos plasmídeos. Um clone foi selecionado e seqüenciado para verificação da orientação de inserção do gene.

6.5.2 Expressão heteróloga da toxina Cry1Ia12.

As células competentes para expressão de *E. coli* BL21-Star (DE) foram transformadas com os vetores descritos no item anterior e multiplicadas em meio seletivo. O primeiro pré-inóculo de 5 mL foi obtido pela inoculação desta transformação. Após 16 h de crescimento, 3 mL deste material foram adicionados a 100 ml de meio de cultura LB-amp. Após a DO_{600} atingir a faixa de 0,6-0,8, IPTG foi adicionado para concentração final de 1 mM. Nas primeiras horas após

a indução nenhuma banda de indução pode ser verificada. Apenas 14 h após a indução, a primeira banda de indução na faixa esperada, com cerca de 70 kDa, pode ser detectada (figura 19).

Quando separado o extrato solúvel do insolúvel, observou-se que grande parte da proteína encontrava-se no precipitado na forma de corpos de inclusão, ou seja, na fração insolúvel, o que dificultaria a obtenção da proteína com função biológica ou mesmo com um grau de pureza adequado para os ensaios posteriores. Desta forma, foram realizados ensaios isolados segundo os protocolos descritos na literatura a fim de obter a maior parte da proteína em sua forma solúvel (Marston, 1986; Blackwell e Horgan, 1991; Schlicke e Brakmann, 2005). A utilização em conjunto de um agente osmótico, sorbitol, com um agente antiagregante, betaína, permitiu a produção da proteína recombinante na sua forma solúvel e em grande quantidade. O resultado deste experimento pode ser visto na figura 19, linhas 2 e 3. Ao final destes ensaios, ficou comprovado que estes agentes funcionaram de modo a produzir uma quantidade elevada da proteína na forma solúvel.

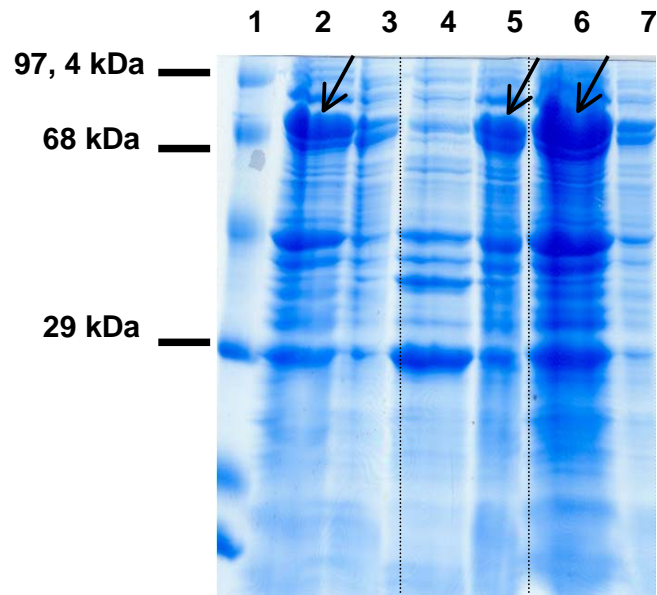


Figura 19: Análise por SDS-PAGE 12% da expressão do gene *cry1Ia12* em sistema heterólogo *E. coli*. A expressão foi induzida com 1 mM IPTG. Após a indução da expressão, as células foram lisadas e o extrato solúvel foi separado do extrato insolúvel por centrifugação. **Linha 1.** Marcador de massa molecular (Invitrogen). **Linha 2.** Fração solúvel do extrato protéico após tratamento com 300 mM Sorbitol e 25mM Betaína. **Linha 3.** Fração insolúvel do extrato protéico após tratamento com 300 mM Sorbitol e 25mM Betaína. **Linha 4.** Fração solúvel do produto da expressão obtido na ausência dos agentes osmótico e anti-agregantes. **Linha 5.** Fração insolúvel do produto da expressão obtido na ausência dos agentes osmótico e anti-agregantes. **Linha 6.** Fração solúvel do produto da expressão obtido na presença de tampão contendo lisozima. **Linha 7.** Fração insolúvel da produto da expressão obtido na presença de lisozima. As setas são referentes à proteína recombinante Cry1Ia12. 25 μ g de cada amostra foram adicionadas a tampão de amostra, submetidas a SDS-PAGE 12%, a 25 mA e coradas com azul de Comassie

6.5.3 Expressão heteróloga da toxina Cry8Ha1.

Diferentemente da toxina Cry11a12, Cry8Ha1 não precipitou em sua grande parte na forma corpos de inclusão. Após 16 h de expressão, a quantidade majoritária da mesma encontrava-se na fração solúvel do extrato protéico total. Quando o tempo de expressão foi aumentado para 20 h observou-se a formação de corpos de inclusão, mas grande parte da proteína ainda encontrava-se na fração solúvel. Limitamos a expressão deste gene por 16 h, momento no qual a maior quantidade de proteína recombinante seria obtida. Desta forma, o gene *cry8Ha1* foi induzido apenas pela adição de 1mM IPTG após o crescimento celular atingir a densidade óptica desejada. A figura 20 mostra os dois extratos protéicos, contendo as referidas frações solúvel e insolúvel.

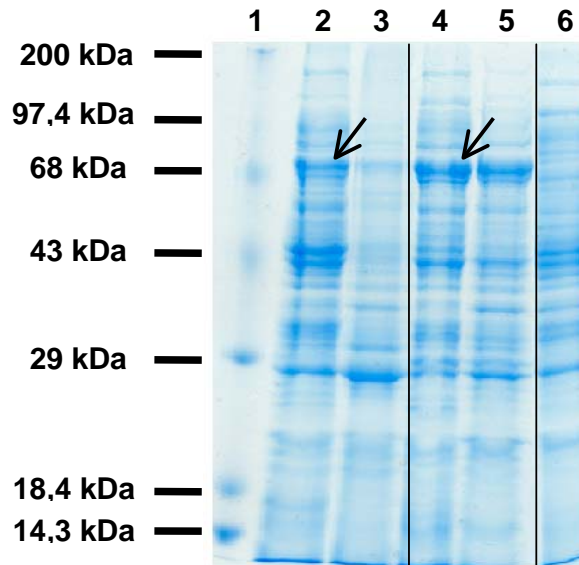


Figura 20: Análise por SDS-PAGE 12% da expressão do gene *cry8Ha1* em sistema heterólogo *E. coli*. A expressão foi induzida com 1 mM IPTG. Após a indução as células foram lisadas e o extrato solúvel foi separado do extrato insolúvel por centrifugação. **Linha 1.** Marcador de peso molecular. **Linha 2.** Fração solúvel do produto da expressão realizada após 16 h de expressão. **Linha 3.** Fração insolúvel do produto da expressão realizada 16 h de expressão. **Linha 4.** Fração solúvel do produto da expressão realizada após 20 h de expressão. **Linha 5.** Fração insolúvel do produto da expressão realizada após 20 h de expressão. **Linha 6.** Extrato total da *E. coli* controle negativo mostrando a ausência da proteína de aproximadamente 70 KDa. As setas indicam a proteína recombinante Cry18Ha1. 25 µg de cada amostra foram adicionadas a tampão de amostra, submetidas a SDS-PAGE 12%, a 25 mA e coradas com azul de Coomassie

6.5.4. Purificação das toxinas recombinantes

A purificação das toxinas recombinantes foi realizada utilizando-se cromatografia de afinidade com a resina Ni-NTA (QUIAGEN). Um experimento piloto de expressão dos genes foi realizada em 1 L de meio de cultura LB-amp nas condições padronizadas. O rendimento foi de 2% (4 mg/L) para Cry1Ia12 e 7% (10 mg/L) para Cry8Ha1 de proteína total solúvel nas condições utilizadas. Em análise de SDS-PAGE 12%, observou-se a presença de apenas uma banda do material eluído, que corresponde às toxinas de interesse, Cry1Ia12 e Cry8Ha1 (figuras 22 e 23). Ao final da purificação o material foi dialisado contra tampão carbonato, visando manter a proteínas nas condições ideais de estabilidade.

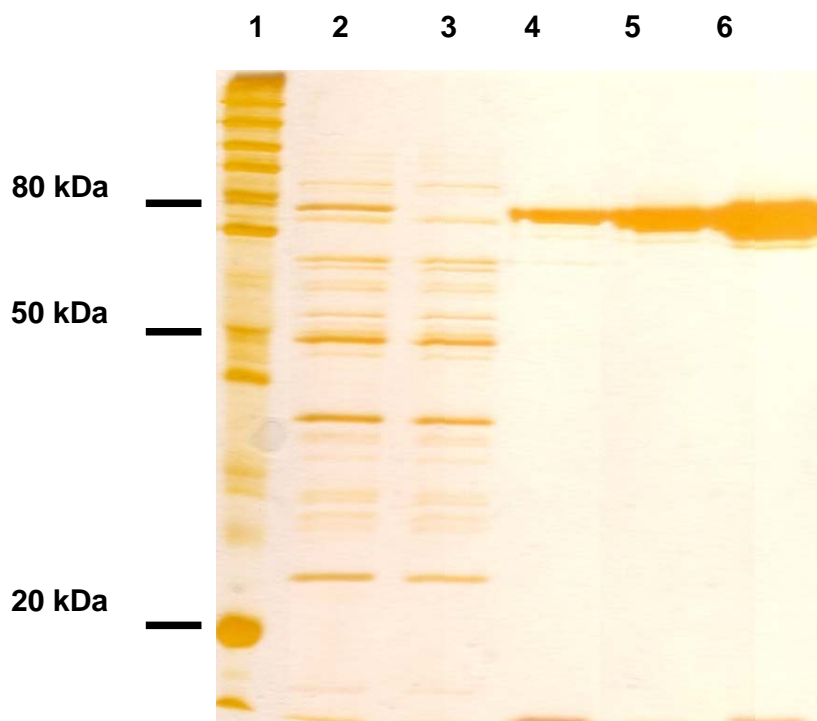


Figura 21: Análise por SDS-PAGE 12% da proteína recombinante Cry1Ia12 purificada por cromatografia de afinidade (Ni-NTA). Linha 1. Marcador de peso molecular. Linha 2. Extrato total da *E. coli* expressando a proteína recombinante Cry1Ia12. Linha 3. Fração não retida na resina Ni-NTA. Linhas 4, 5 e 6. Proteína Cry1Ia12 eluída da resina Ni-NTA em diferentes concentrações para confirmação do grau de pureza da mesma. 5 µg (linhas 2, 3 e 4), 10 µg (linha 5) e 15 µg (linha 6) de amostra foram adicionadas a tampão de amostra, submetidas a SDS-PAGE 12%, a 25 mA e coradas com nitrato de prata.

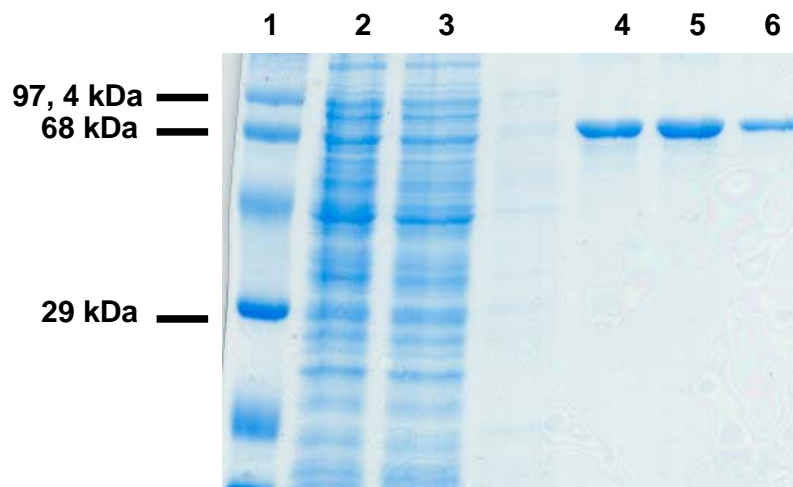


Figura 22: Análise por SDS-PAGE 12% da proteína recombinante Cry8Ha1 purificada por cromatografia de afinidade (Ni-NTA). Linha 1. Marcador de peso molecular. **Linha 2.** Extrato total da *E. coli* expressando a proteína recombinante Cry8Ha1. **Linha 3.** Fração não retida na resina Ni-NTA. **Linhas 4, 5 e 6.** Proteína Cry8Ha1 eluída da resina Ni-NTA em diferentes concentrações para confirmação do grau de pureza da mesma. 5 μ g (linhas 2, 3 e 4), 10 μ g (linha 5 e 6) de amostra foram adicionadas a tampão de amostra, submetidas a SDS-PAGE 12%, a 25 mA e coradas com azul de Coomassie.

6.6. Bioensaios

Com a finalidade de verificar a atividade das toxinas recombinantes foram realizados os bioensaios contra os insetos-praga de interesse. Após a incorporação das proteínas na dieta das larvas dos insetos a quantidade de larvas vivas e mortas foi contada. A concentração na qual 50% dos indivíduos tiveram mortalidade pode ser observada na figura 23.

Para a toxina Cry11a12 a concentração na qual se obtém 50% de mortalidade para *S. frugiperda* foi de 5 μ g/mL enquanto que para *A. grandis* foi de 230 μ g/mL. A toxina Cry8Ha1 não apresentou ação tóxica contra *S. frugiperda* e apresentou uma toxicidade de 160 μ g/mL contra *A. grandis*, ou seja, nessa

concentração foi capaz de matar 50% dos indivíduos. Os dados finais foram obtidos após a realização de quatro repetições em dias distintos e períodos diferentes da colônia dos insetos.

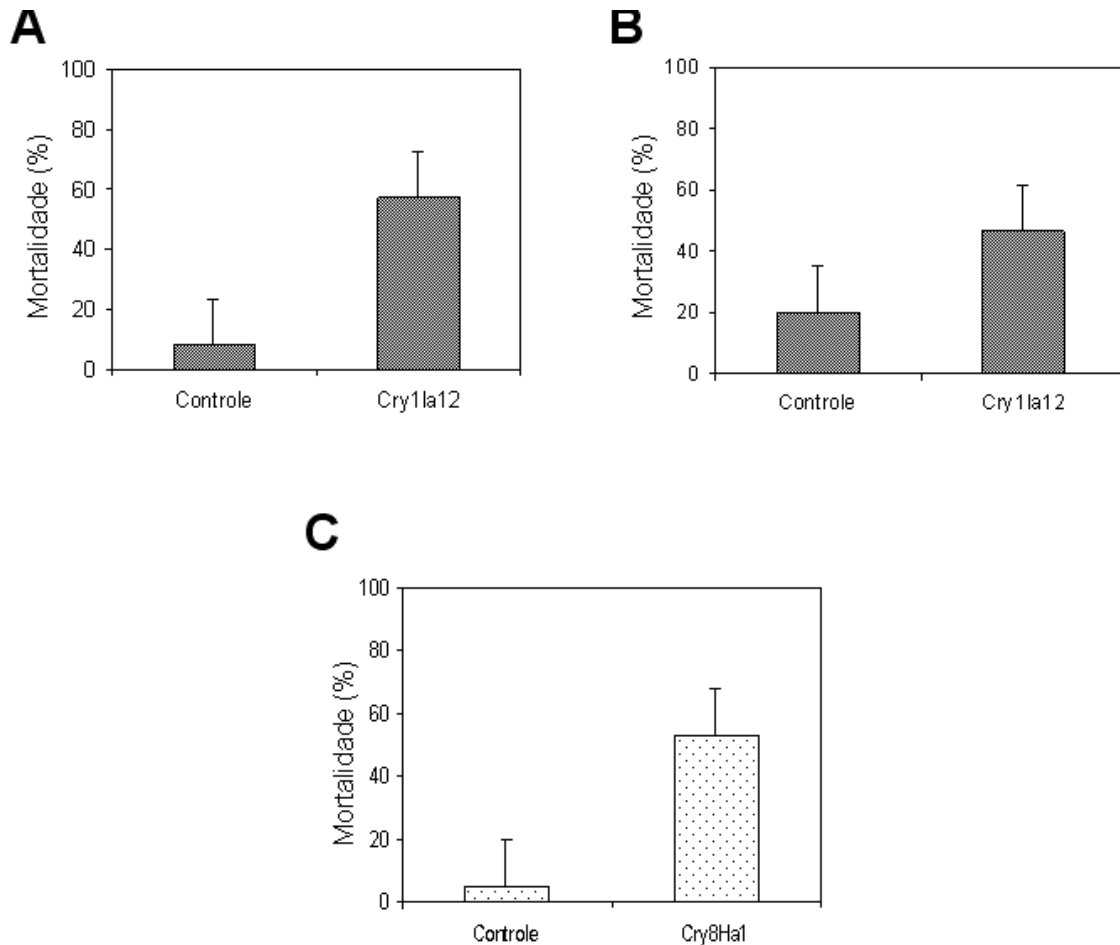


Figura 23: Bioensaios contra *A. grandis* e *S. frugiperda* com as toxinas Cry1Ia12 e Cry8Ha1 recombinantes. (A) Bioensaio contra *S. frugiperda* utilizando Cry1Ia12. Dieta de superfície demonstrando mortalidade de 50% na concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$. (B) Bioensaio contra *A. grandis* utilizando Cry1Ia12. Dieta incorporada demonstrando mortalidade de 50% na concentração de 230 $\mu\text{g/mL}$. (C) Bioensaio contra *A. grandis* utilizando Cry8Ha1. Dieta incorporada demonstrando mortalidade de 50% na concentração de 160 $\mu\text{g/mL}$. Como controle foi utilizada a água de diálise na qual as proteínas foram submetidas. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas com 30 insetos de *A. grandis* e 90 de *S. frugiperda*.

7. DISCUSSÃO

Este trabalho relata a caracterização morfológica, protéica e molecular de uma estirpe de Bt isolada de solo brasileiro, denominada S811, que apresenta alta toxicidade sobre os insetos-praga, *A. grandis* e *S. frugiperda*. Estudos preliminares mostraram que 91,6% das larvas de *A. grandis* e 95% das larvas neonatas de *S. frugiperda* foram controladas (mortas) em bioensaios seletivos com as culturas esporuladas (tabela 1). As análises do extrato protéico e da morfologia dos cristais corroboraram com os resultados encontrados nos bioensaios, uma vez que foram identificados proteínas e cristais característicos de estirpes com atividade para lepidópteros e coleópteros. Sendo a atividade inédita e eficaz contra uma das mais importantes pragas do algodoeiro, *A. grandis*, e de resultados iniciais sugestivos, experimentos foram conduzidos no sentido de determinar as moléculas responsáveis pela atividade entomotóxica dessa estirpe.

Para a identificação da presença destas moléculas na estirpe S811 foi utilizada a técnica de PCR com oligonucleotídeos específicos e gerais descritos por Ceron *et al.* (1995) e Bravo *et al.* (1998). Três prováveis genes *cry* distintos foram identificados: *cry1Ia*, *cry8* e *cry1Ab*. A presença do último gene já havia sido sugerida pelos dados de perfis eletroforéticos (figura 5) e análises morfológicas (figura 6) onde uma proteína de alto peso (~130 kDa) e cristais bipiramidais foram identificados, respectivamente. Esse mesmo perfil foi descrito para a estirpe padrão Btk HD1, a qual produz os mesmos cristais a partir da agregação da toxina Cry1Ab (Hofte e Whiteley, 1989). Esta toxina pertence ao grupo das toxinas lepidóptero-específicas mais estudadas (Ribeiro e Crook, 1998) e, diversos ensaios de toxicidade já foram realizados demonstrando que toxinas desta natureza não possuem atividade para *S. frugiperda* (Perlak *et al.*, 2001; Estela *et al.*, 2004). Por esta razão, não houve interesse, por parte de nosso grupo, em obter a seqüência completa deste gene para posterior averiguação de atividade.

Tendo em vista a atividade inseticida das toxinas do grupo Cry1I para insetos das ordens Lepidoptera e Coleoptera (Tailor *et al.*, 1992), oligonucleotídeos específicos foram desenhados para obtenção, por PCR, da seqüência gênica completa do fragmento gênico *cry1I* identificado (figura 10). Após a análise da seqüência o mesmo foi denominado *cry1Ia12*, segundo as normas estabelecidas pelo comitê de nomenclatura de *B. thuringiensis* (Crickmore *et al.*, 1998). A técnica

de PCR para detecção de genes *cry1I* mostrou-se eficiente uma vez que a identificação dos produtos protéicos de genes desta natureza é limitada por métodos bioquímicos. Isso ocorre devido aos baixos níveis de expressão da toxina (Porcar e Juarez-Perez, 2003) ou, mais provavelmente, como sugerido por (Kostichka *et al.*, 1996), devido à secreção da mesma durante a fase anterior à esporulação. Os baixos níveis de expressão podem estar relacionados com a efetividade variada entre estirpes que possuem genes semelhantes. Assim, com base nos resultados de SDS-PAGE (figura 5) não é possível afirmar que a proteína de aproximadamente 70-80 kDa corresponde a uma toxina do grupo Cry1I.

Quando foi analisada a seqüência predita da toxina Cry1Ia12 notou-se que esta difere em um ou dois resíduos de aminoácidos das demais toxinas Cry1Ia descritas. Estas modificações encontram-se na região correspondente aos domínios estruturais I e II. Sabendo que o domínio I (composto de sete alfa-hélices antiparalelas) é o responsável pela formação do poro (Bravo *et al.*, 2002) e que o domínio II está envolvido com reconhecimento e ligação das toxinas Cry aos seus receptores específicos (De Maagd *et al.*, 2001), a presença de pequenas alterações pode afetar a relação proteína-receptor de uma toxina. Modificações na região do domínio I podem ser interpretadas de maneira positiva uma vez que estudos recentes com receptores para toxinas Cry apontam as aminopeptidases como elementos importantes no processo de formação de poros, atuando na clivagem da primeira alfa-hélice (localizada na região do domínio I), para subsequente formação do núcleo hidrofóbico, oligomerização e, finalmente, da estrutura porosa sobre a membrana do intestino do inseto (Bravo *et al.*, 2004). Estas enzimas possuem uma especificidade dirigida dependendo da composição da região, a qual pretendem clivar, podendo ser específicas para distintas porções N-terminais, como já demonstrado para as aminopeptidases de insetos para diferentes toxinas Cry (Lorence *et al.*, 1997; Bravo *et al.*, 2002; Zhuang *et al.*, 2002). Pequenas modificações podem mudar as características hidrofóbicas das toxinas, fazendo com que aminopeptidases, presentes em um determinado inseto, não sejam capazes de realizar este processamento nessas variantes, como descrito por Bravo *et al.* (2004). Assim, alterações nos domínios I e II podem sugerir uma anulação do núcleo hidrofóbico no domínio I, com conseqüente perda de atividade para as toxinas em questão ou, a geração de uma atividade nova, como no caso observado neste trabalho.

A proteína recombinante Cry11a12 foi obtida com sucesso no sistema heterólogo pET (*E. coli*) e, após a otimização da expressão, grande parte da toxina Cry11a12 encontrou-se ativa e na fração do solúvel do extrato celular (figura 19). Inicialmente, foi observado um grande acúmulo de proteína na forma de corpos de inclusão no interior da célula. Este tipo de situação ocorre geralmente com proteínas de alto peso molecular e/ou quando os vetores de expressão possuem promotores muito fortes. Neste último caso, os genes são transcritos em uma velocidade tão elevada que a maquinaria das células não consegue realizar o dobramento completo e/ou correto das proteínas em tempo hábil (Marston, 1986). Conseqüentemente, as proteínas expõem suas regiões hidrofóbicas, associando-se intermolecularmente, precipitando dentro da célula formando os chamados corpos de inclusão. Existem vários métodos para solubilizar as proteínas dos corpos de inclusão. Para as toxinas Cry os protocolos descrevem a utilização de tampões de pH extremamente alcalino antecidos de uma quantidade elevada de procedimentos experimentais, o que dificulta bastante a condição de trabalho.

Neste contexto, buscou-se uma técnica ainda inédita para proteínas Cry, onde a obtenção da proteína ativa na fração solúvel foi possível através da utilização dos protocolos descritos por Blackwell e Horgan (1991) e Georgiou e Valax (1996). A metodologia envolve a geração de um estresse osmótico, através do sorbitol, o qual facilita a entrada do agente antiagregante (betaína) na célula. O sorbitol atua apenas no desbalanço, para geração de poros na membrana celular, sendo incapaz de permeabilizá-la, não intervindo sobre o dobramento das proteínas citoplasmáticas. Desta forma, o aumento da pressão osmótica permite a entrada da betaína, que estabiliza as estruturas das proteínas nativas. Blackwell e Horgan (1991) demonstraram que células crescendo na presença de sorbitol e betaína produzem 400X mais proteínas recombinantes quando comparadas ao controle. Nossos estudos corroboram com dados anteriores, pois mostraram que a toxina Cry11a12 teve um aumento significativo, na fração solúvel do extrato (figura 19).

Devido a grandes dificuldades de preparo de meio de cultura em elevadas concentrações de sorbitol, buscou-se uma outra metodologia a qual utilizava lisozima em tampão de extração. Posteriormente, pode-se observar que esta metodologia funcionava tão bem quanto a anterior, podendo ser utilizada em produções em larga escala com sucesso. A redução do número de etapas em um processo de expressão é muito importante uma vez que baixa custos de produção e

evita a perda de material durante os procedimentos experimentais (Escoubas *et al.*, 2003).

Sabendo que a maioria das toxinas Cry1Ia-recombinantes (expressas em sistema homólogo ou heterólogo) apresenta atividade para lepidópteros e, em poucos casos, para coleópteros, foram realizados bioensaios com o intuito de determinar a atividade tóxica de Cry1Ia12, onde se constatou alta atividade para o inseto *A. grandis*. Até a presente data, o único coleóptero susceptível a uma toxina Cry1Ia foi *Leptinotarsa decemlineata*, o qual foi efetivamente controlado por Cry1Ia1 (Tailor *et al.*, 1992). Interessante notar que a toxina Cry1Ia4 diferencia-se desta toxina em apenas dois aminoácidos, não apresentando toxicidade para o mesmo inseto e sendo tóxica para os lepidópteros *Ostrinia nubilalis* e *P. xylostella* (Kostichka *et al.*, 1996). A toxina Cry1Ia2, tóxica para lepidópteros como *Epiphyas postvittana*, não apresenta ação tóxica para insetos coleópteros como *Tenebrio molitor* (Gleave *et al.*, 1993). A toxina Cry1Ia3 tóxica para diversos lepidópteros (*Artogeia rapae*, *B. mori* e *P. xylostella*), não apresenta atividade para outros lepidópteros como *S. exigua* assim como nenhuma atividade contra os coleópteros *Agelastica coerulea* e *Phaedon brassica* (Shin *et al.*, 1995). Quando expressa em tabaco, Cry1Ia5, foi tóxica para diversos lepidópteros como *Helicoverpa armigera* e não teve qualquer toxicidade descrita para coleópteros (Selvapandiyan, 1996).

As demais toxinas Cry1I, descritas na literatura (Cry1Ib, c, d, e, and f), são muito similares com as Cry1Ia descritas neste trabalho, destacando-se pela sua elevada toxicidade única contra lepidópteros, como por exemplo, Cry1Ie1, que demonstrou ser altamente tóxica para lepidópteros como: *Leguminivora glycinivorella* (9,02 µg/mL), *Ostrinia furnacalis* (LC₅₀= 2,22 µg/mL) e *P. xylostella* (0,20 µg/mL) sendo bem mais efetiva do que Cry1Ia3, Cry1Ib1 e Cry1Id1. Esta mesma toxina também foi testada contra o coleóptero *Pyrrhalta aenescens* não sendo tóxica. Mas quando expressa em plantas de tabaco apresentou atividade para *Ostrinia furnacalis*, causando mortalidade superior a 80% (Liu *et al.*, 2004).

Dentre as 40 toxinas do tipo Cry1I já descritas, Cry1Ia1 apresenta-se como a única toxina efetiva contra insetos Coleópteros, e Lepidópteros do gênero *Spodoptera* (Sasaki *et al.*, 1996). Neste contexto, a taxa de mortalidade de 230 µg/ml de Cry1Ia12 contra *A. grandis* mostra-se bastante similar a LC₅₀ de Cry1Ia1

encontrada para *L. decemlineata* de 250 µg/mL, que reflete um potencial inseticida moderado em condições experimentais.

Além do gene *cry11a12*, também foi isolado um gene do grupo do grupo *cry8*. Este apresenta grande relevância para geração de moléculas capazes de controlar as pragas *A. grandis* e *S. frugiperda*. O novo gene *cry8* evidenciado por PCR (figura 11) possui 58% de identidade de aminoácidos com relação a outras toxinas Cry8, as quais são conhecidas por serem coleóptero-específicas. Juntamente com toxinas do grupo Cry3A, as toxinas Cry8 formam o maior grupo de toxinas Cry, efetivas no controle de coleópteros. Este é um forte indício de que boa parcela da atividade da estirpe S811 sobre *A. grandis* deve-se à toxina Cry8. Sendo este, um novo gene, a obtenção de sua seqüência completa tornou-se um passo muito importante, uma vez que novas correlações de toxicidade poderão ser estabelecidas. Para a obtenção da seqüência completa do gene, foi utilizada a técnica de TAIL-PCR, a qual é bastante utilizada na obtenção de regiões promotoras desconhecidas de genes conhecidos. Na literatura, esta é a primeira vez que a técnica é empregada para obtenção da seqüência completa de um gene Cry e a mesma mostrou-se bastante eficaz e rápida.

Embora o gene *cry8Ha1* não tenha sido clonado por completo, a porção faltante do C-terminal não aparece como um problema uma vez que para determinação de atividade e geração de plantas transgênicas são necessárias somente as regiões compreendidas pelos três domínios estruturais e o N-terminal da proteína (Perlak *et al.*, 1990). Assim como na toxina Cry11a12, os domínios I e II mostram-se os mais heterogêneos quando comparado com outras proteínas de mesma natureza sugerindo novas atividades/especificidades inseticidas para o gene isolado. As análises de seqüências mostraram uma aparente troca de domínios entre os genes *cry8*, gerando a alta variabilidade descrita neste trabalho. Esta suspeita foi igualmente relatada por Asano *et al* (2003) que observou a presença de blocos em regiões distintas das toxinas Cry8. Este grupo ainda realizou a modelagem *in silico* da toxina Cry8Da mostrando muitas similaridades com a toxina Cry3Aa, onde todos os resíduos conservados entre as duas moléculas encontravam-se para o interior da proteína, principalmente os localizados nas α -hélices que se voltavam para dentro das mesmas. Estes mesmos resíduos conservados são observados na seqüência de Cry8Ha1. Análises de domínios conservados

revelaram uma homologia moderada nos domínios II das toxinas Cry8Aa, Cry8Da, Cry9Ba, Cry9Ca, Cry9Da e Cry9Ea. Esta identidade já havia sido descrita por Crickmore (2000), onde as toxinas Cry9Da e Cry8Aa são descritas como sendo ativas para insetos da ordem Coleoptera. Estes indícios são bastante fortes e mostram que realmente pode haver uma especificidade relacionada com a região compreendida no domínio II.

Para testar a atividade da toxina, o gene *cry8Ha1* foi clonado no vetor de expressão pET (*E. coli*). Os procedimentos foram um pouco distintos daqueles aplicados para a toxina Cry1Ia12 uma vez que a toxina Cry8Ha1 não formou corpos de inclusão em quantidade elevada. Por isso, sua obtenção foi bem mais simples constituindo em um passo de lise e de purificação, da mesma forma que foi precedido com a toxina Cry1Ia12.

As toxinas do tipo Cry8 são caracterizadas como sendo ativas para insetos da ordem Coleoptera. Por exemplo, Cry8Aa1 e Cry8Ba1 controlam os coleópteros (escarabeídeos) *Cotinis spp.*, *Cyclocephala borealis* e *Cyclocephala pasadenae*, em diferentes ambientes e condições experimentais (Michaels *et al.*, 1994). A toxina Cry8Da1 controla o coleóptero *Anomala cuprea* onde 80% dos insetos da população são mortos. Cry3Aa1 controla a 70 µg/ml, 57% de uma população de coleópteros *Premnotypes vorax*, sendo este um valor razoável para o controle de insetos coleópteros. Nenhuma toxicidade destes genes foi relatada para lepidópteros da mesma forma que Cry8Ha1 não apresentou atividade para o lepidóptero *Spodoptera frugiperda*. A análise da toxicidade contra *A. grandis* mostrou que 160 µg/ml da toxina Cry8Ha1 foram capazes de controlar 50% da larva, descrevendo assim uma toxicidade deste tipo de toxinas para este inseto.

Até a presente data mais de 300 toxinas Cry foram descritas, muitas delas com grande capacidade para controlar uma grande variedade de insetos, incluindo membros das mais distintas ordens como lepidópteros, coleópteros, dípteros e himenópteros, assim como nematóides (Schnepf *et al.*, 1998; Hilder e Boulter, 1999; De Maagd *et al.*, 2001; De Maagd *et al.*, 2003; Huffman *et al.*, 2004; Jouanin, 1998). Além de Cry1Ia12 e Cry8Ha1 (o presente trabalho), as toxinas de Bt Cry3Aa1, Cry23A/Cry37 (toxina binária) foram efetivas contra *A. grandis* (Herrnstadt *et al.*, 1986; Donovan e Slaney, 2000). E, de forma contrária às toxinas Bt Cry3Aa, Cry1Aa, Cry1Ac, Cry2Aa (Sims, 1997), Cry3Aa4 (Macintosh *et al.*, 1990) e Cry3Ba2 (Lambert *et al.*, 1992), adicionada em dietas de larvas de *A. grandis* não foram

tóxicas. Desde o primeiro trabalho científico de Herrnstadt (1986), que reportou uma toxina Cry efetiva contra *A. grandis*, nenhuma cultivar transgênica resistente a esta praga foi gerada, mesmo sendo esta de grande importância para a cotonicultura em muitos países.

Em 1996, a empresa Monsanto lançou sua primeira cultivar de algodão transgênica (Bollgard Monsanto Co., St. Louis, Mo), a qual foi utilizada para o controle de lepidópteros. Mesmo sendo muito eficaz para certos lepidópteros como *Heliothis virescens* e *Pectinophora gossypiella*, ainda eram necessárias aplicações suplementares de químicos para o controle de outros como *S. frugiperda*, *S. exigua*, *Helicoverpa armigera* e *Helicoverpa punctigera* (Adamczyk Jr e Meredith Jr, 2004). Recentemente, foi lançada a cultivar Bollgard II, a qual traz em seu genoma o gene *cry2Ab2*, que aumentou a atividade inseticida das plantas, controlando em baixa escala *S. frugiperda*, mas sem ser eficaz contra *A. grandis* (Sims, 1997). Em 2003, foi lançado no mercado o milho Bt com o gene coleóptero-específico *cry3Bb*, conferindo toxicidade para *Diabrotica* ssp. Plantas de batata expressando genes *cry3Aa*, que estavam no mercado desde 1996, foram retiradas de circulação devido à nova geração de pesticidas eficazes no combate a besouros e afídeos que reduziram os custos com insumos agrícolas. Deixando, desta forma, o mercado aberto para a introdução de novos cultivares eficazes para o combate de coleópteros.

Diante disso, podemos concluir que o uso de genes *cry* para obtenção de plantas transgênicas que controlam o ataque de insetos, representa uma estratégia promissora. Entretanto, uma seleção bastante rigorosa deve ser feita considerando-se a fisiologia e a bioquímica dos insetos-alvo e não-alvo. Este trabalho demonstra que as toxinas Cry11a12 e Cry8Ha1 são ativas para os dois insetos mais devastadores da cultura do algodão, *A. grandis* e *S. frugiperda*, abrindo perspectivas para obtenção de uma nova geração de cultivares de algodão transgênicas Cry.

Estudos futuros devem ser conduzidos no sentido de melhorar os genes para redução de problemas específicos, tais como o aparecimento de resistências. Questões as quais poderão ser solucionadas por meio de técnicas como *DNA shuffling* que se mostra bastante eficaz para o melhoramento de genes *cry* com características importantes. Essa visão permite a associação inteligente de várias linhas de estudos que visam única e somente um produto final de competitividade.

8. PERSPECTIVAS

Identificar o mecanismo de ação das toxinas Cry11a12 e Cry8Ga1 para a elucidação da dinâmica molecular de interação e geração de novas moléculas de maior toxicidade e especificidade contra os insetos-alvo. Estes estudos, em andamento, estão sendo realizados utilizando um biosensor baseado no fenômeno de Ressonância Plasmônica de Superfície (Biacore 3000). Ambas as toxinas foram imobilizadas em "chips" com cadeias de dextran carboxi-metilado e as vesículas obtidas a partir do intestino médio dos insetos (BBMVs) foram injetadas nas superfícies protéicas. A complexação entre as proteínas Cry e as BBMVs é monitorada em tempo real, sendo que os analitos estão sendo micro-recuperados, identificados e parcialmente seqüenciados por espectrometria de massa em tandem (MS/MS). A próxima etapa deste trabalho envolve a determinação das constantes cinéticas da interação das toxinas pelas BBMVs.

Estudos de proteômica através de eletroforese bidimensional e espectrometria de massa estão caracterizando a estirpe S811 com o intuito de identificar outras toxinas, assim como outros fatores que possam estar envolvidos na potencialização dos efeitos observados neste trabalho. Assim, poderão ser identificadas as moléculas que atuam em sinergismo com as toxinas aqui descritas. Este trabalho está sendo realizado pelo aluno de doutorado Érico Rosas Vasconcelos, sob orientação da Dra. Fátima Grossi.

Diversas bibliotecas combinatórias estão sendo construídas onde mutantes são selecionados por afinidade a receptores de membrana celular dos insetos. Resultados recentes demonstram mutantes com atividade inseticida superior as toxinas "nativas". Estas seleções estão sendo realizadas pelo aluno de mestrado do PPGBCM Gustavo Ramos de Oliveira, sob orientação da Dra. Fátima Grossi.

Os genes *cry11a12* e *cry8Ha1* tiveram suas seqüências nucleotídicas modificadas com o intuito de favorecer o código genético das plantas de algodão ("codon usage"). Estes genes sintéticos foram clonados em vetores de expressão para plantas e estão sendo introduzidos em plantas modelo, *Nicotiana tabacum*, e plantas de algodão através de transformação via tubopolínico.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adamczyk, J. J., L. C. Adams e D. D. Hardee. Field efficacy and seasonal expression profiles for terminal leaves of single and double *Bacillus thuringiensis* toxin cotton genotypes. Journal of Economic Entomology, v.94, n.6, DEC, p.1589-1593. 2001.

Adamczyk Jr, J. J. e W. R. Meredith Jr. Genetics for variability of Cry1Ac expression among commercial transgenic *Bacillus thuringiensis* (Bt) cotton cultivars in the United States. The journal of cotton Science, v.8, p.17-23. 2004.

Aronson, A. Sporulation and delta-endotoxin synthesis by *Bacillus thuringiensis*. Cellular and Molecular Life Sciences, v.59, n.3, MAR, p.417-425. 2002.

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

Asano, S., C. Yamashita, T. Iizuka, K. Takeuchi, S. Yamanaka, D. Cerf e T. Yamamoto. A strain of *Bacillus thuringiensis* subsp *galleriae* containing a novel *cry8* gene highly toxic to *Anomala cuprea* (Coleoptera : Scarabaeidae). Biological Control, v.28, n.2, OCT, p.191-196. 2003.

Battisti, L., B. D. Green e C. B. Thorne. Mating System for Transfer of Plasmids among *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*. Journal of Bacteriology, v.162, n.2, p.543-550. 1985.

Baum, J. A. e T. Malvar. Regulation of insecticidal crystal protein production in *Bacillus thuringiensis*. Mol Microbiol, v.18, n.1, Oct, p.1-12. 1995.

Beltrão. O agronegócio do algodão no Brasil, v.01. 1999

Benintende, G. e A. M. Marquez. Bactérias entomopatógenas. In: R. Lecuona. (Ed.). Em microorganismos patógenos empleados en el Control Microbiano de Insectos Plaga, v.4: Bacterias Entomopatógenas, 1996. Bactérias entomopatógenas., p.61-65

Blackwell, J. R. e R. Horgan. A novel strategy for production of a highly expressed recombinant protein in an active form. FEBS Lett, v.295, n.1-3, Dec 16, p.10-12. 1991.

Bravo, A., I. Gomez, J. Conde, C. Munoz-Garay, J. Sanchez, R. Miranda, M. Zhuang, S. S. Gill e M. Soberon. Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes, v.1667, n.1, NOV 17, p.38-46. 2004.

Bravo, A., S. Jansens e M. Peferoen. Immunocytochemical Localization of *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Crystal Proteins in Intoxicated Insects. Journal of Invertebrate Pathology, v.60, n.3, NOV, p.237-246. 1992.

- Bravo, A., R. Miranda, I. Gomez e M. Soberon. Pore formation activity of Cry1Ab toxin from *Bacillus thuringiensis* in an improved membrane vesicle preparation from *Manduca sexta* midgut cell microvilli. Biochim Biophys Acta, v.1562, n.1-2, May 3, p.63-69. 2002.
- Bravo, A., S. Sarabia, L. Lopez, H. Ontiveros, C. Abarca, A. Ortiz, M. Ortiz, L. Lina, F. J. Villalobos, G. Pena, M. E. Nunez-Valdez, M. Soberon e R. Quintero. Characterization of *cry* genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. Appl Environ Microbiol, v.64, n.12, Dec, p.4965-4972. 1998.
- Ceron, J., L. Covarrubias, R. Quintero, A. Ortiz, M. Ortiz, E. Aranda, L. Lina e A. Bravo. PCR analysis of the *cryI* insecticidal crystal family genes from *Bacillus thuringiensis*. Appl Environ Microbiol, v.60, n.1, Jan, p.353-356. 1994.
- Ceron, J., A. Ortiz, R. Quintero, L. Guereca e A. Bravo. Specific PCR primers directed to identify *cryI* and *cryIII* genes within a *Bacillus thuringiensis* strain collection. Appl Environ Microbiol, v.61, n.11, Nov, p.3826-3831. 1995.
- Crickmore, N., D. R. Zeigler, J. Feitelson, E. Schnepf, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum e D. H. Dean. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. Microbiology and Molecular Biology Reviews, v.62, n.3, SEP, p.807-+. 1998.
- Cruz, I., M. Figueiredo e M. J. Matoso. Controle biológico de *Spodoptera frugiperda* utilizando o parasitóide de ovos Trichograma. Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, p.40p. 1999.
- De Maagd, R. A., A. Bravo, C. Berry, N. Crickmore e H. E. Schnepf. Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. Annu Rev Genet, v.37, p.409-433. 2003.
- De Maagd, R. A., A. Bravo e N. Crickmore. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. Trends Genet, v.17, n.4, Apr, p.193-199. 2001.
- De Souza, M. T., M. M. Lecadet e D. Lereclus. Full expression of the *cryIIIA* toxin gene of *Bacillus thuringiensis* requires a distant upstream DNA sequence affecting transcription. J Bacteriol, v.175, n.10, May, p.2952-2960. 1993.
- Donovan, W. P. D., J.C. e A. C. Slaney. *Bacillus thuringiensis* CryET33 and CryET34 proteins - having activity against Coleoptera insects, particularly boll weevil, red flour beetle and Japanese beetle.. U.S. Patent 2000.
- Escoubas, P., C. Bernard, G. Lambeau, M. Lazdunski e H. Darbon. Recombinant production and solution structure of PcTx1, the specific peptide inhibitor of ASIC1a proton-gated cation channels. Protein Sci, v.12, n.7, Jul, p.1332-1343. 2003.
- Estela, A., B. Escriche e J. Ferre. Interaction of *Bacillus thuringiensis* toxins with larval midgut binding sites of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera : Noctuidae). Applied and Environmental Microbiology, v.70, n.3, MAR, p.1378-1384. 2004.

Ferry, N., M. Edwards, J. Gatehouse, T. Capell, P. Christou e A. Gatehouse. Transgenic plants for insect pest control: A forward looking scientific perspective. Transgenic Research, v.15, n.1, FEB, p.13-19. 2006.

Freire, E. C. Cultivares e produção de semente na melhoria da qualidade do algodão no nordeste e centro-oeste do Brasil. Boletim informativo EMBRAPA/ CNPA. 1997.

Fundação, M. G. Boletim de Pesquisa de Algodão. Rondonópolis, MT, v.Boletim 4. 2001. 238 p.

Garcia-Robles, I., J. Sanchez, A. Gruppe, A. C. Martinez-Ramirez, C. Rausell, M. D. Real e A. Bravo. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* PS86Q3 strain in hymenopteran forest pests. Insect Biochemistry and Molecular Biology, v.31, n.9, JUL 26, p.849-856. 2001.

Georgiou, G. e P. Valax. Expression of correctly folded proteins in *Escherichia coli*. Curr Opin Biotechnol, v.7, n.2, Apr, p.190-197. 1996.

Gill, S. S., E. A. Cowles e V. Francis. Identification, Isolation, and Cloning of a *Bacillus thuringiensis* CryIac Toxin-Binding Protein from the Midgut of the Lepidopteran Insect *Heliothis-Virescens*. Journal of Biological Chemistry, v.270, n.45, NOV 10, p.27277-27282. 1995.

Gill, S. S., H. K. Lee, D. I. Oltean, M. Zhuang, M. D. Kawalek e H. Cheong. Structure and mode of action of *Bacillus thuringiensis* toxins. Abstracts of Papers of the American Chemical Society, v.217, MAR 21, p.U84-U84. 1999.

Gleave, A. P., R. Williams e R. J. Hedges. Screening by Polymerase Chain-Reaction of *Bacillus thuringiensis* Serotypes for the Presence of Cryv-Like Insecticidal Protein Genes and Characterization of a Cryv Gene Cloned from *Bacillus thuringiensis* Subsp Kurstaki. Applied and Environmental Microbiology, v.59, n.5, MAY, p.1683-1687. 1993.

Gomez, I., J. Sanchez, R. Miranda, A. Bravo e M. Soberon. Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix alpha-1 in domain I and oligomer prepore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. Febs Letters, v.513, n.2-3, FEB 27, p.242-246. 2002.

Grochulski, P., L. Masson, S. Borisova, M. Pusztai, J. L. Schwartz, R. Brousseau e M. Cygler. *Bacillus thuringiensis* CryIa(a) Insecticidal Toxin - Crystal-Structure and Channel Formation. Journal of Molecular Biology, v.254, n.3, DEC 1, p.447-464. 1995.

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

Haynes, J. W. e J. W. Smith. Longevity of Laboratory-Reared Boll-Weevils (Coleoptera, Curculionidae) Offered Honey Bee-Collected Pollen and Plants

- Unrelated to Cotton. Journal of Entomological Science, v.27, n.4, OCT, p.366-374. 1992.
- Herrnstadt, C., G. G. Soares, E. R. Wilcox e D. L. Edwards. A New Strain of *Bacillus thuringiensis* with Activity against Coleopteran Insects. Bio-Technology, v.4, n.4, APR, p.305-308. 1986.
- Hilder, V. A. e D. Boulter. Genetic engineering of crop plants for insect resistance - a critical review. Crop Protection, v.18, p.177-191. 1999.
- Hofmann, C., H. Vanderbruggen, H. Hofte, J. Vanrie, S. Jansens e H. Vanmellaert. Specificity of *Bacillus thuringiensis* Sigma-Endotoxins Is Correlated with the Presence of High-Affinity Binding-Sites in the Brush-Border Membrane of Target Insect Midguts. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.85, n.21, NOV, p.7844-7848. 1988.
- Hofte, H. e H. R. Whiteley. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiol Rev, v.53, n.2, Jun, p.242-255. 1989.
- Huffman, D. L., L. J. Bischof, J. S. Griffiths e R. V. Aroian. Pore worms: using *Caenorhabditis elegans* to study how bacterial toxins interact with their target host. Int J Med Microbiol, v.293, n.7-8, Apr, p.599-607. 2004.
- Johnson, D. E., B. Oppert e W. H. Mcgaughey. Spore coat protein synergizes *Bacillus thuringiensis* crystal toxicity for the indianmeal moth (*Plodia interpunctella*). Current Microbiology, v.36, n.5, MAY, p.278-282. 1998.
- Jouanin, L. B.-B., M.; Girard, C.; Morrot, G. & Giband, M. Transgenic plants for insect resistance. Plant Sci., p. 131:131-111. 1998.
- Knight, P. J. K., N. Crickmore e D. J. Ellar. The Receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIa(C) Delta-Endotoxin in the Brush-Border Membrane of the Lepidopteran *Manduca sexta* Is Aminopeptidase-N. Molecular Microbiology, v.11, n.3, FEB, p.429-436. 1994.
- Knowles, B. H. e D. J. Ellar. Colloid-Osmotic Lysis Is a General Feature of the Mechanism of Action of *Bacillus thuringiensis* Delta-Endotoxins with Different Insect Specificity. Biochimica Et Biophysica Acta, v.924, n.3, JUN 22, p.509-518. 1987.
- Kostichka, K., G. W. Warren, M. Mullins, A. D. Mullins, J. A. Craig, M. G. Koziel e J. J. Estruch. Cloning of a *cryV-type* insecticidal protein gene from *Bacillus thuringiensis*: The *cryV*-encoded protein is expressed early in stationary phase. Journal of Bacteriology, v.178, n.7, APR, p.2141-2144. 1996.
- Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, v.227, n.5259, Aug 15, p.680-685. 1970.
- Lambert, B., H. Hofte, K. Annys, S. Jansens, P. Soetaert e M. Peferoen. Novel *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Crystal Protein with a Silent Activity against

Coleopteran Larvae. Applied and Environmental Microbiology, v.58, n.8, AUG, p.2536-2542. 1992.

Lee, M. K., T. H. You, B. A. Young, J. A. Cotrill, A. P. Valaitis e D. H. Dean. Aminopeptidase N purified from gypsy moth brush border membrane vesicles is a specific receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIAc toxin. Applied and Environmental Microbiology, v.62, n.8, AUG, p.2845-2849. 1996.

Lereclus, D., A. Delécluse e M. M. Lecadet. Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. In Entwistle, P.F., Cory, J.S., Bailey, M.J. and Higgs, S. (ed.), *Bacillus thuringiensis. An Environmental Biopesticide: Theory and Practice*, n.John Wiley & Sons, New York, p.37-69. 1993.

Li, J. D., J. Carroll e D. J. Ellar. Crystal-Structure of Insecticidal Delta-Endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5-Å Resolution. Nature, v.353, n.6347, OCT 31, p.815-821. 1991.

Liu, Y. G., N. Mitsukawa, T. Oosumi e R. F. Whittier. Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. Plant J, v.8, n.3, Sep, p.457-463. 1995.

Liu, Y. J., F. P. Song, K. L. He, Y. Yuan, X. X. Zhang, P. Gao, J. H. Wang e G. Y. Wang. Expression of a modified Cry1Ie gene in *E. coli* and in transgenic tobacco confers resistance to corn borer. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), v.36, n.4, Apr, p.309-313. 2004.

Lorence, A., A. Darszon e A. Bravo. Aminopeptidase dependent pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin on *Trichoplusia ni* membranes. FEBS Lett, v.414, n.2, Sep 8, p.303-307. 1997.

Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr e R. J. Randall. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem, v.193, n.1, Nov, p.265-275. 1951.

Macintosh, S. C., T. B. Stone, S. R. Sims, P. L. Hunst, J. T. Greenplate, P. G. Marrone, F. J. Perlak, D. A. Fischhoff e R. L. Fuchs. Specificity and Efficacy of Purified *Bacillus thuringiensis* Proteins against Agronomically Important Insects. Journal of Invertebrate Pathology, v.56, n.2, SEP, p.258-266. 1990.

Mahillon, J., R. Rezsóhazy, B. Hallet e J. Delcour. Is231 and Other *Bacillus thuringiensis* Transposable Elements - a Review. Genetica, v.93, n.1-3, p.13-26. 1994.

Marchler-Bauer, A., J. B. Anderson, P. F. Cherukuri, C. Deweese-Scott, L. Y. Geer, M. Gwadz, S. He, D. I. Hurwitz, J. D. Jackson, Z. Ke, C. J. Lanczycki, C. A. Liebert, C. Liu, F. Lu, G. H. Marchler, M. Mullokandov, B. A. Shoemaker, V. Simonyan, J. S. Song, P. A. Thiessen, R. A. Yamashita, J. J. Yin, D. Zhang e S. H. Bryant. CDD: a Conserved Domain Database for protein classification. Nucleic Acids Res, v.33, n.Database issue, Jan 1, p.D192-196. 2005.

Marchler-Bauer, A., J. B. Anderson, C. Deweese-Scott, N. D. Fedorova, L. Y. Geer, S. He, D. I. Hurwitz, J. D. Jackson, A. R. Jacobs, C. J. Lanczycki, C. A. Liebert, C. Liu, T. Madej, G. H. Marchler, R. Mazumder, A. N. Nikolskaya, A. R. Panchenko, B. S. Rao, B. A. Shoemaker, V. Simonyan, J. S. Song, P. A. Thiessen, S. Vasudevan, Y. Wang, R. A. Yamashita, J. J. Yin e S. H. Bryant. CDD: a curated Entrez database of conserved domain alignments. Nucleic Acids Res, v.31, n.1, Jan 1, p.383-387. 2003.

Marston, F. A. The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*. Biochem J, v.240, n.1, Nov 15, p.1-12. 1986.

Martins, É. S., L. B. Praça, V. F. Dumas, E. H. Sone, I. C. Waga, A. C. M. M. Gomes, R. Falcão e R. G. Monnerat. ESTUDO DA ATIVIDADE E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E MOLECULAR DE ESTIRPES DE *Bacillus thuringiensis* TÓXICAS AO BICUDO-DO-ALGODOEIRO (*Anthonomus grandis* Boheman, 1983). Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, v.83, n.1ª edição, p.1676 – 1340. 2005.

Michaels, T. E., K. E. Narva e L. Focerrada. *Bacillus thuringiensis* toxins active against scarab pests. Uspto - United States patents and trademarks office. USA: Mycogen Corporation 1994.

Morse, R. J., T. Yamamoto e R. M. Stroud. Structure of Cry2Aa suggests an unexpected receptor binding epitope. Structure, v.9, n.5, MAY 9, p.409-417. 2001.

Page, R. D. M. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. Computer Applications in the Biosciences, v.12, p.357-358. 1996.

Panizzi, A. R. Efeito de inseticidas na população das principais pragas da soja. An. Soc. Entomol. Brasil, v.6, p.264-275. 1977.

Panizzi, A. R. Efeito de inseticidas na população das principais pragas da soja. An. Soc. Entomol. Brasil, v.6, p.264-275. (1977).

Perlak, F. J., R. W. Deaton, T. A. Armstrong, R. L. Fuchs, S. R. Sims, J. T. Greenplate e D. A. Fischhoff. Insect resistant cotton plants. Biotechnology (N Y), v.8, n.10, Oct, p.939-943. 1990.

Perlak, F. J., M. Oppenhuizen, K. Gustafson, R. Voth, S. Sivasupramaniam, D. Heering, B. Carey, R. A. Ihrig e J. K. Roberts. Development and commercial use of Bollgard (R) cotton in the USA - early promises versus today's reality. Plant Journal, v.27, n.6, SEP, p.489-501. 2001.

Porcar, M. e V. Juarez-Perez. PCR-based identification of *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal genes. Fems Microbiology Reviews, v.26, n.5, JAN, p.419-432. 2003.

Raney, T. Economic impact of transgenic crops in developing countries. Curr Opin Biotechnol, Mar 4. 2006.

- Rausell, C., C. Munoz-Garay, R. Miranda-Cassoluengo, I. Gomez, E. Rudino-Pinera, M. Soberon e A. Bravo. Tryptophan spectroscopy studies and black lipid bilayer analysis indicate that the oligomeric structure of Cry1Ab toxin from *Bacillus thuringiensis* is the membrane-insertion intermediate. Biochemistry, v.43, n.1, JAN 13, p.166-174. 2004.
- Reddy, A., L. Battisti e C. B. Thorne. Identification of Self-Transmissible Plasmids in 4 *Bacillus thuringiensis* Subspecies. Journal of Bacteriology, v.169, n.11, NOV, p.5263-5270. 1987.
- Ribeiro, B. M. e N. E. Crook. Construction of occluded recombinant baculoviruses containing the full-length *cry1Ab* and *cry1Ac* genes from *Bacillus thuringiensis*. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v.31, n.6, JUN, p.763-769. 1998.
- Richetti, A. e G. A. Melo Filho. Aspectos econômicos do algodoeiro. In: Embrapa Agropecuária Oeste; Embrapa Algodão. Algodão: tecnologia de produção., p.296. 2002.
- Sangadala, S., F. S. Walters, L. H. English e M. J. Adang. A Mixture of *Manduca sexta* Aminopeptidase and Phosphatase Enhances *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Cryia(C) Toxin Binding and (Rb+-K+)-Rb-86 Efflux in-Vitro. Journal of Biological Chemistry, v.269, n.13, APR 1, p.10088-10092. 1994.
- Santos, W. J. Identificação, biologia, amostragem e controle das pragas do algodoeiro. In: Embrapa Agropecuária Oeste; Embrapa Algodão. Algodão: tecnologia de produção., p. 296p. 2002.
- Sasaki, J., S. Asano, T. Iizuka, H. Bando, B. W. Lay, S. Hastowo, G. K. Powell e T. Yamamoto. Insecticidal activity of the protein encoded by the *cryV* gene of *Bacillus thuringiensis* kurstaki INA-02. Current Microbiology, v.32, n.4, APR, p.195-200. 1996.
- Schlicke, M. e S. Brakmann. Expression and purification of histidine-tagged bacteriophage T7 DNA polymerase. Protein Expr Purif, v.39, n.2, Feb, p.247-253. 2005.
- Schnepf, E., N. Crickmore, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D. R. Zeigler e D. H. Dean. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. Microbiology and Molecular Biology Reviews, v.62, n.3, SEP, p.775-+. 1998.
- Selvapandiyar, A. A. B., R.K. Isolation, cloning and expression of *cryV* gene. Unpublished, v.Crickmore webpage references Toxin Databank. 1996.
- Shimizu, T. e K. Morikawa. The beta-prism: a new folding motif. Trends Biochem Sci, v.21, n.1, Jan, p.3-6. 1996.
- Shin, B. S., S. H. Park, S. K. Choi, B. T. Koo, S. T. Lee e J. I. Kim. Distribution of Cryv-Type Insecticidal Protein Genes in *Bacillus thuringiensis* and Cloning of Cryv-Type Genes from *Bacillus thuringiensis* Subsp Kurstaki and *Bacillus thuringiensis*

Subsp Entomocidus. Applied and Environmental Microbiology, v.61, n.6, JUN, p.2402-2407. 1995.

Silvie, P., T. Leroy, J. L. Belot e B. Michel. Manual de identificação das pragas e seus danos no algodoeiro. 2001. 100p p. (COODETEC. Cascavel)

Sims, S. R. Host activity spectrum of the CryIIA *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaki protein. Effects on Lepidoptera, Diptera, and non-target arthropods. Southwestern Entomologist, v.22, p.395-404. 1997.

Taylor, R., J. Tippett, G. Gibb, S. Pells, D. Pike, L. Jordan e S. Ely. Identification and Characterization of a Novel *Bacillus thuringiensis* Delta-Endotoxin Entomocidal to Coleopteran and Lepidopteran Larvae. Molecular Microbiology, v.6, n.9, MAY, p.1211-1217. 1992.

Thomas, W. E. e D. J. Ellar. *Bacillus thuringiensis* var israelensis crystal delta-endotoxin: effects on insect and mammalian cells in vitro and in vivo. J Cell Sci, v.60, Mar, p.181-197. 1983.

Thompson, J. D., D. G. Higgins e T. J. Gibson. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res, v.22, n.22, Nov 11, p.4673-4680. 1994.

Woltersberger, M.G. V-ATPase-energized epithelia and biological insect control. J Exp Biol, v. 172, p.377-86. 1992.

Whiteley, H.R e Schnepf, H.E. The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. Annu Rev Microbiol, v.40, p.549-76. Review. 1986

Vadlamudi, R. K., T. H. Ji e L. A. Bulla. A Specific Binding-Protein from *Manduca-Sexta* for the Insecticidal Toxin of *Bacillus thuringiensis* Subsp Berliner. Journal of Biological Chemistry, v.268, n.17, JUN 15, p.12334-12340. 1993.

Vadlamudi, R. K., E. Weber, I. H. Ji, T. H. Ji e L. A. Bulla. Cloning and Expression of a Receptor for an Insecticidal Toxin of *Bacillus thuringiensis*. Journal of Biological Chemistry, v.270, n.10, MAR 10, p.5490-5494. 1995.

Vie, V., N. Van Mau, P. Pomarede, C. Dance, J. L. Schwartz, R. Laprade, R. Frutos, C. Rang, L. Masson, F. Heitz e C. Le Grimellec. Lipid-induced pore formation of the *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa insecticidal toxin. Journal of Membrane Biology, v.180, n.3, APR 1, p.195-203. 2001.

Zhuang, M., D. I. Oltean, I. Gomez, A. K. Pullikuth, M. Soberon, A. Bravo e S. S. Gill. *Heliothis virescens* and *Manduca sexta* lipid rafts are involved in Cry1A toxin binding to the midgut epithelium and subsequent pore formation. J Biol Chem, v.277, n.16, Apr 19, p.13863-13872. 2002.

CURRICULUM VITAE

1 DADOS PESSOAIS

Nome: Mariana Torquato Quezado de Magalhães

Nome em citações bibliográficas: Quezado, M.

Nascimento: 11/07/1980, Halifax - Canadá

Endereço profissional:

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia, Cenargen.

Estação Parque Biológico Final da W5 norte

Laboratório de Interação Molecular Planta-Praga

Asa Norte

70849-970 BRASILIA, DF - Brasil

Telefone: (61) 34484705

E-mail: mquezado@cenargen.embrapa.br

2 FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

2004 - 2006 Mestrado em Biologia Celular e Molecular.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Rio Grande do Sul, Brasil.

Título: Toxinas Cry: Perspectivas para obtenção de algodão transgênico brasileiro.

Ano de obtenção: 2006.

Orientador: Dra Maria Fátima Grossi-de-Sá.

Bolsista do(a): EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, Brasil.

1998 - 2003 Graduação em Agronomia.

Universidade de Brasília, UNB, Distrito Federal, Brasil.

Título: Caracterização bioquímica e molecular de uma estirpe de *Bacillus thuringiensis* efetiva

contra o bicudo-do-algodoeiro - *Anthonomus grandis*.

Orientador: Dr João Nogueira B. Aguiar

Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPQ, Brasil.

3 ATUAÇÃO PROFISSIONAL

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA

Vínculo institucional

2003 - 2004 Vínculo: Bolsista de Pesquisa, Enquadramento funcional: Bolsista Recém -Formada,

Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva.

Outras informações

Estágio junto à EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, sob orientação da Dra. Maria Fátima Grossi de Sá e coordenação do Dr. João Aguiar Nogueira Batista. Projeto de isolamento e caracterização de genes Bt e outros genes de resistência.

2003 - 2003 Vínculo: Bolsa EMBRAPA - IC, Enquadramento funcional: Bolsista de Iniciação Científica,
Carga horária: 20.

Outras informações

Estágio junto à EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, sob orientação da Dra. Maria Fátima Grossi de Sá e coorientação do Dr. Octávio Luiz Franco. Projeto de isolamento e caracterização de genes de resistência do feijoeiro contra as pragas dos grãos armazenados. 2) Continuação do projeto Bt.

2002 - 2003 Vínculo: Bolsa EMBRAPA - IC, Enquadramento funcional: Bolsista Iniciação Científica,
Carga horária: 20.

Outras informações

Estágio junto à EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, sob orientação da Dra. Maria Fátima Grossi de Sá e coorientação do Dr. João Aguiar Nogueira Batista. Projeto Bt. Caracterização e isolamento de genes de Bt de uma estirpe efetiva contra o bicudo-do-algodoeiro, *Anthonomus grandis*

2001 - 2002 Vínculo: Bolsa EMBRAPA - IC, Enquadramento funcional: Bolsista Iniciação Científica,
Carga horária: 20.

Outras informações

Estágio junto à EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, sob orientação da Dra. Maria Fátima Grossi de Sá e coorientação do Dr. João Aguiar Nogueira Batista. Projeto de isolamento de gene *cry* de *Bacillus thuringiensis*.

1999 - 2000 Vínculo: Bolsa Rhae/ ITI, Enquadramento funcional: Bolsista Iniciação Científica, Carga horária: 20.

Outras informações

Estágio junto ao Laboratório de Genética de Plantas - EMBRAPA - Cenargen, sob orientação da Dra. Ana Yamaguishi Ciampi. Trabalho com marcadores moleculares na caracterização de espécies arbóreas brasileiras de importância econômica (Jatobá, Virola e *Dalbergia nigra*)

2004 - Atual Vínculo: Bolsista de Mestrado, Enquadramento funcional: Mestranda,
Carga horária: 40,
Regime: Dedicção exclusiva.

Atividades

8/2003 - 2/2004 Estágios, Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia, Cenargen.

Estágios realizados

1. Continuação dos projetos no Laboratório plantas - praga - orientação Dra. Maria Fátima Grossi de Sá.

2/2003 - 7/2003 Estágios, Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia, Cenargen.

Estágios realizados

1. Laboratório de plantas -praga. Orientação: Dra. Maria Fátima Grossi de Sá e Dr.

Octavio Luiz Franco - Clonagem de genes com atividade contra insetos-praga de importância econômica.

2/2002 - 1/2003 Estágios, Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia, Cenargen.

Estágios realizados

1. Laboratório de Plantas-praga - Orientação Dra. Maria Fátima Grossi de Sá e Dr. João Aguiar Nogueira Batista. Título do trabalho: Caracterização de uma nova estirpe de *Bacillus thuringiensis* efetiva contra *Anthonomus grandis*.

1/2001 - 1/2002 Estágios, Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia, Cenargen.

Estágios realizados

1. Laboratório de plantas-praga - Orientação: Dra. Maria Fátima Grossi de Sá. título do trabalho: Prospecção de genes de *Bacillus thuringiensis* contra insetos praga do algodoeiro.

7/1999 - 12/2000 Estágios, Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia, Cenargen.

Estágios realizados

1. Bolsista Rhae/ ITI, CNPq - Laboratório de Genética de Plantas. Orientação: Dra. Ana Yamaguishi Ciampi. Título do Trabalho: Utilização de Marcadores Moleculares RAPD na análise de diversidade de espécies arbóreas tropicais.

3/2004 - Atual Outras atividades técnico-científicas, Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia, Cenargen.

Atividades realizadas

1. Estudante de Mestrado.

4 ÁREAS DE ATUAÇÃO

- | | |
|---|--|
| 1 | Bioquímica, Química de Proteínas |
| 2 | Biologia Molecular. |
| 3 | Fitossanidade, Fitopatologia. |
| 4 | Fitotecnia, Melhoramento Vegetal. |
| 5 | Genética, Genética Molecular e de Microorganismos. |

5 IDIOMAS

Compreende: Espanhol (Razoavelmente), Inglês (Bem),
 Fala: Espanhol (Pouco), Inglês (Bem), Português (Bem).
 Lê: Espanhol (Razoavelmente), Inglês (Bem),
 Escreve: Espanhol (Razoavelmente), Inglês (Bem),

6 PRÊMIOS E TÍTULOS

2004 3o. lugar - IX Encontro do Talento Estudantil - Categoria de PÓS-GRADUANDOS, EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia.

2002 1o. lugar - VII Encontro do Talento Estudantil - Categoria GRADUANDOS,

EMBRAPA - Recursos Genéticos e Biotecnologia.
2000 3o. lugar - V Encontro do Talento Estudantil - Categoria GRADUANDOS,
EMBRAPA - Recursos Genéticos e Biotecnologia.

7 PRODUÇÃO CIENTÍFICA, TECNOLÓGICA E ARTÍSTICA/CULTURAL

7.1 PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

7.1.1 Trabalhos completos em anais de eventos

1 Quezado, M.; DAYLER, C.A; FRANCO, Octávio; BLOCH Jr, C; PRATES, M.V; M.F, Grossi de Sa, Cloning and Characterization of a Novel alpha-Amylase Inhibitor from Bean Seeds with a Chitinolytic Activity. In: IN: XXXIII REUNIÃO ANUAL DO SBBQ, 2004, CAXAMBÚ. ANAIS DA XXXIII REUNIÃO ANUAL DA, 2004, Caxambú. 2004.

2 Quezado, M.; BATISTA, João Aguiar Nogueira; FRAGOSO, Rodrigo da Rocha; SILVA, Shirley Margareth Buffon; OLIVEIRA NETO, Osmundo Brilhante de; SÁ, Maria Fátima Grossi de Molecular Cloning of a New Crystal Protein Gene of a *Bacillus thuringiensis* Strain Highly Effective Against The Cotton Bollweevil. In: IN: XXXIII REUNIÃO ANUAL DO SBBQ, 2004, Caxambu -MG. 2004.

7.1.2 Resumos simples em anais de eventos

1 M.F, Grossi de Sa,; Quezado, M.; BATISTA, João Aguiar Nogueira; SILVA, Shirley Margareth Buffon; FRAGOSO, Rodrigo da Rocha; OLIVEIRA NETO, Osmundo Brilhante de Molecular cloning of a new gene encoding a Cry protein effective towards cotton Boll weevil, *Anthonomus grandis*. In: SIP 2004, 2004, Helsinki. Society for Invertebrate 37th Annual Meeting, 2004. p. B26. In: HELSINKI. SOCIETY FOR INVERTEBRATE 37TH ANNUAL MEETING, 2004, Helsinki. 2004. p. B26.

2 M.F, Grossi de Sa,; Quezado, M. Toxinas Cry e Sua Aplicação no Controle do Bicudo do Algodoeiro (*Anthonomus grandis*). In: IN: XX CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA,, 2004, Gramado. 2004.

3 SÁ, Maria Fátima Grossi de; Quezado, M.; OLIVEIRA NETO, Osmundo Brilhante de; FRAGOSO, Rodrigo da Rocha; SILVA, Shirley Margareth Buffon; MONERRAT, R.; BATISTA, João Aguiar Nogueira Molecular cloning of a new crystal protein gene of a *Bacillus thuringiensis* strain highly effective against cotton boll weevil - *Anthonomus grandis*. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT MOLECULAR BIOLOGY, 2003, Barcelona. Book of Abstracts - 7th International Congress of Plant Molecular Biology. 2003. p. 447-447.

4 Quezado, M.; SILVA, Shirley Margareth Buffon; FRAGOSO, Rodrigo da Rocha; BATISTA, João Aguiar Nogueira; OLIVEIRA NETO, Osmundo Brilhante de; MONERRAT, R.; SÁ, Maria Fátima Grossi de Caracterização bioquímica e clonagem de genes Cry de uma estirpe de *Bacillus thuringiensis* efetiva contra o Bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis*). In: VII ENCONTRO DO TALENTO ESTUDANTIL DA EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA, 2002, Brasília. Anais do VII Encontro do Talento Estudantil. 2002. v. VII, p. 34-34.

5 Quezado, M.; SUGANUMA, E.; CIAMPI, A.Y. Análise da Variabilidade Genética em Espécies Arbóreas Tropicais Nativas com uso de marcador molecular RAPD. In: 520. CONGRESSO DE BOTÂNICA, 2001, João Pessoa. 520. Congresso de Botânica. 2001.

6 MACHADO, F.R.B; Quezado, M.; SILVA, V.P.da; CIAMPI, A.Y. Análise da Variabilidade Genética de populações de *Dalbergia nigra* (Jacarandá-da-bahia) da mata atlântica com o uso de marcador molecular RAPD. In: VI ENCONTRO DO TALENTO ESTUDANTIL DA EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA, 2001, Brasília. Anais do VI Encontro do Talento Estudantil da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 2001. v. VI, p. 49-49.

7 Quezado, M.; SILVA, Shirley Margareth Buffon; FRAGOSO, Rodrigo da Rocha; OLIVEIRA NETO, Osmundo Brilhante de; BATISTA, João Aguiar Nogueira; MONERRAT, R.; SÁ, Maria Fátima Grossi de Caracterização e clonagem de estirpes de *Bacillus thuringiensis* ativas contra bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis*). In: VI ENCONTRO DO TALENTO ESTUDANTIL DA EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA, 2001, Brasília. Anais do VI Encontro do Talento Estudantil da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 2001. p. 31-31.

8 Quezado, M.; DORNELLES, K.; CIAMPI, A.Y. Análise da variabilidade genética de *Hymenaea courbail* (jatobá) com uso de marcador molecular RAPD em diferentes biomas do território brasileiro In: V encontro do talento estudantil, 2000, Brasília. In: V ENCONTRO DO TALENTO ESTUDANTIL, 2000, Brasília. V Encontro do Talento Estudantil. 2000. v. 5, p. 41-41.

9 Quezado, M.; DORNELLES, K.; CIAMPI, A.Y. Análise da Variabilidade Genética de Jatobá com uso de Marcador Molecular RAPD. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 2000, Águas de Lindóia. Genetics and Molecular Biology. 2000. v. 23, p. 461-461.

7.1.3 Resumos expandidos em anais de eventos

1 SILVA, Shirley Margareth Buffon; Quezado, M.; BATISTA, João Aguiar Nogueira; OLIVEIRA NETO, Osmundo Brilhante de; MONERRAT, R.; FRAGOSO, Rodrigo da Rocha; SÁ, Maria Fátima Grossi de Characterization of a novel brazilian strains *Bacillus thuringiensis* effective against *Spodoptera frugiperda* and other insect pests. In: IV CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO, 2003, Goiânia. IV Congresso Brasileiro de Algodão. 2003.

2 BATISTA, João Aguiar Nogueira; Quezado, M.; FRAGOSO, Rodrigo da Rocha; SILVA, Shirley Margareth Buffon; OLIVEIRA NETO, Osmundo Brilhante de; MONERRAT, R.; SÁ, Maria Fátima Grossi de Molecular cloning of a new *cry08* gene of a *Bacillus thuringiensis* strain highly effective against cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*). In: IV CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO, 2003, Goiânia. IV Congresso Brasileiro de Algodão. 2003.

3 Quezado, M.; SUGANUMA, E.; CIAMPI, A.Y. ANÁLISE DA VARIABILIDADE

GENÉTICA EM ESPÉCIES ARBÓREAS TROPICAIS NATIVAS COM O USO DE MARCADOR MOLECULAR RAPD. In: I CONGRESSO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 2001, Gioânia. Congresso de Melhoramento de Plantas. 2001. v. 1.

4 CIAMPI, A.Y.; Quezado, M.; SUGANUMA, E. Análise da Variabilidade Genética em Espécies Arbóreas Tropicais Nativas com uso de marcador molecular RAPD. In: IV ENCONTRO LATINO AMERICANO DE BIOTECNOLOGIA, IV Encontro Latino Americano de Biotecnologia. 2001. p. 148-148.

7.1.4 Artigos completos publicados em periódicos

1 SILVA, Shirley Margareth Buffon; WERNECK, J.S.O; FALCÃO, R.; GOMES, A.C; FRAGOSO, Rodrigo da Rocha; Quezado, M.; OLIVEIRA NETO, Osmundo Brilhante de; BATISTA, João Aguiar Nogueira; SÁ, Maria Fátima Grossi de; MONERRAT, R.; BRAVO, A. Characterization of novel Brazilian *Bacillus thuringiensis* strains active against *Spodoptera frugiperda* and other insect pests. Journal Of Applied Entomology-Zeitschrift Für Angewandte Entomologie, 2003.

2 CIAMPI, A.Y.; Quezado, M. Análise da variabilidade genética de três espécies arbóreas utilizando marcador molecular RAPD. CPAP - Boletim de Pesquisa EMBRAPA, EMBRAPA, 2001.

8 PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS

1 VII Encontro do Talento Estudantil. 2002. (Participação em eventos/Encontro).

2 52o. Congresso de Botânica. 2001. (Participação em eventos/Congresso).

3 I Congresso de Melhoramento de Plantas. 2001. (Participação em eventos/Congresso).

4 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Científica. 2001. (Participação em eventos/Congresso).

5 VI Encontro do Talento Estudantil da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 2001. (Participação em eventos/Encontro).

6 49o. Congresso Brasileiro de Genética. 2000. (Participação em eventos/Congresso).

7 V Encontro do Talento Estudantil. 2000. (Participação em eventos/Encontro).

8 V Encontro do Talento Estudantil. 2000. (Participação em eventos/Encontro).

9 XXXIII REUNIÃO ANUAL DO SBBQ, 2004, CAXAMBÚ. (Participação em eventos/Encontro).

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)