



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ANA PAULA SCARAMAL RICIETO

**IDENTIFICAÇÃO, CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DE
GENES *cry1I* DE ISOLADOS BRASILEIROS DE *Bacillus
thuringiensis***

Londrina
2013

ANA PAULA SCARAMAL RICIE TO

**IDENTIFICAÇÃO, CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DE
GENES *cry1I* DE ISOLADOS BRASILEIROS DE *Bacillus
thuringiensis***

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Genética e Biologia
Molecular da Universidade Estadual de
Londrina como pré-requisito para obtenção
do título de Mestre

Orientador: Prof. Gislayne Trindade Vilas-
Bôas

Londrina
2013

**Catlogação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

R538i Ricieto, Ana Paula Scaramal.
Identificação, clonagem e sequenciamento de genes *cryII* de isolados brasileiros de *Bacillus thuringiensis* / Ana Paula Scaramal Ricieto. – Londrina, 2013.
79 f. : il.

Orientador: Gislayne Fernandes Lemes Trindade Vilas-Bôas.
Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2013.
Inclui bibliografia.

1. Bacillus thuringiensis – Teses. 2. Proteínas de bactérias – Teses. 3. Bactérias – Genética – Teses. 4. Genes – Clonagem – Teses. I. Vilas-Bôas, Gislayne Fernandes Lemes Trindade. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. III.

CDU 579.852.1

ANA PAULA SCARAMAL RICIE TO

**IDENTIFICAÇÃO, CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DE
GENES *CRY1I* DE ISOLADOS BRASILEIROS DE *Bacillus
thuringiensis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina como pré-requisito para obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Celso Duarte de Carvalho Filho
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dra. Daniele Sartori
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Gislayne Trindade Vilas-Bôas
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 28 de fevereiro de 2013

Dedico

À Deus e Nossa Senhora, por me agradecer em mais esta etapa.

Aos meus pais, Luiz Ricietto e Luzia Scaramal Ricietto, que me ensinaram princípios para que eu crescesse acreditando que tudo me é possível mas nem tudo me convém.

À Mariani, pela alegria de ser sua irmã.

Agradecimentos

"Desistir? Eu já pensei seriamente nisso, mas nunca me levei realmente a sério. É que tem mais chão nos meus olhos do que cansaço nas minhas pernas, mais esperança nos meus passos do que tristeza nos meus ombros, mais estrada no meu coração do que medo na minha cabeça."

Cora Coralina

À Deus, por me amparar nos momentos de desânimo, me dar forças para transpor as dificuldades, orientar sempre o melhor caminho a ser tomado e permitir acordar para um novo dia de bênçãos.

À Nossa Senhora, por ser minha intercessora ao Pai.

Aos meus pais *Luiz* e *Luzia*, pelos exemplos que ensinam, exemplos de fé, amor e doação.

À minha irmã *Mariani*, que me ensina com sua determinação a superar as dificuldades. Obrigado por seu amor, carinho, amizade e por acreditar e ajudar a conquistar meus sonhos.

À minha família, pelos momentos de união, força, incentivo e amizade. Em especial às minhas amadas avós *Miguelina* e *Laurinda* (em memória) que me ensinaram com suas sabedorias e serenidades.

Às minhas tias *Fátima*, *Francisca*, *Ivani* e *Odete*, pelo apoio incondicional, sem vocês nada disto seria possível!

À tia *Bete*, por ser minha maior incentivadora, por estar sempre disposta a orientar e corrigir.

Aos meus primos *João Paulo* e *João Marcos*, que compartilham comigo as alegrias e incertezas das escolhas.

À minha orientadora querida, *Dra. Gislayne Trindade Vilas-Bôas*, pela acolhida, desprendimento em transmitir seus conhecimentos, pela dedicação, confiança, carinho e amizade que fizeram esta etapa ser mais leve. Deus escolheu a pessoa certa para participar da minha vida e ajudar a tornar realidade as minhas metas. Obrigado Gis!!!

Ao *Dr. Laurival Antônio Vilas-Boas*, pelos *bons dedos de prosa* que mudaram os rumos da minha vida. Pela humildade no ensinar e paciência em orientar, por ser este grande amigo!

Aos amigos de laboratório, *André, Fernanda, Josiane* e *Gabriel*, pela convivência, pela cumplicidade, respeito, risos e sorrisos e pela fraterna amizade conquistada, muito obrigado!!!

Aos agregados e mais novos integrantes do laboratório de Genética e Taxonomia de Bactérias, *Luísa, Kelly, Janaína, Nadal, Fernanda Henrique, Priscilla* e *Amanda*, pelo apoio, paciência, carinho e amizade.

Ao *João Godoy*, pelo suporte técnico e convivência.

Aos amigos do LAGEA, *Dhiego, Wilson, Rafael, Fernanda, Alessandra* pela amizade, conversas, momentos de distração .

À *Karen Mayumi Suzuki, Luana Rodrigues* e *Kátia Rocha* pela paciência em ensinar os caminhos do sequenciamento.

À professora *Fernanda Simões de Almeida*, por importantes sugestões na Qualificação.

À professora *Dra. Daniele Sartori*, a quem admiro, por sua disponibilidade e pelas correções na Qualificação e por ter aceito em participar da banca examinadora.

Ao professor *Dr. Celso Duarte Carvalho Filho*, pela amizade e disposição. Por compartilhar ensinamentos e experiências de vida.

A coordenação e aos professores da pós-graduação em Genética e Biologia Molecular pelo convívio e aprendizado.

À *Sueli*, nossa querida secretária, pela ajuda com os papéis, pelos e-mails que nos divertem, pela amizade.

Aos amigos distantes, meu afilhado *Otávio*, *Cândida* e *Vagner*, minhas amigas *Ana Cristina*, *Adriana*, *Andréia* e tantos outros, que sempre acreditaram e apoiaram, lembrem-se que *para se estar junto, não precisa estar ao lado, mas sim do lado de dentro...*

À CAPES, pelo suporte financeiro à pesquisa.

Ao Programa de Cooperação Internacional CAPES/MINCYT, chamada 2011.

Enfim, agradeço a todos os familiares, amigos e profissionais que de alguma forma se fizeram presentes e contribuíram para a conclusão desta etapa.

A todos, OBRIGADA!!

RICIETO, Ana Paula Scaramal. **Identificação, clonagem e sequenciamento de genes *cry1I* de isolados brasileiros de *Bacillus thuringiensis***. 2013. 79 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2013.

RESUMO

O uso de bactérias entomopatogênicas como o *Bacillus thuringiensis*, como inseticidas biológicos tem se mostrado uma das alternativas viáveis ao uso de inseticidas sintéticos. A atividade entomopatogênica é atribuída principalmente aos cristais paraesporais, os quais são compostos por um ou mais tipos de proteínas tóxicas, como as Cry que possuem especificidade para insetos de diferentes ordens. Esta dissertação apresenta uma revisão que aborda a descrição de *B. thuringiensis*, o mecanismo de ação das proteínas Cry, genes *cry* e suas classificações, um artigo apresentando a clonagem de um gene *cry* de *B. thuringiensis* BR145 e uma terceira parte composta por resultados complementares obtidos para *B. thuringiensis* BR09. Neste trabalho foram utilizadas técnicas moleculares associadas às ferramentas de bioinformática visando à obtenção da sequência completa de um gene *cry* de uma linhagem de *B. thuringiensis* e sua posterior clonagem. A linhagem de *B. thuringiensis* BR145, isolada de solo, foi selecionada por PCR através dos iniciadores degenerados. O gene *cry1I* foi identificado nessa linhagem. As sequências obtidas foram homólogas a região central do gene. Sendo assim, novos iniciadores foram selecionados à partir de regiões consenso, homólogas às sequências de outros genes *cry1I*, visando obter as sequências completas das extremidades dos genes pela metodologia *primer walking*. Neste estudo, obteve-se a clonagem do gene *cry1Ia* completo das linhagens BR09 e BR145 e a sequência completa desse gene de *B. thuringiensis* BR145, bem como a sequência de aminoácidos da proteína Cry1Ia de *B. thuringiensis* BR145 composta por 719 aminoácidos e com massa equivalente a 81 kDa.

Palavras-chave: *B. thuringiensis*. Genes *cry* e *cry1I*. *Primer walking* e clonagem.

RICIETO, Ana Paula Scaramal. **Identification, cloning and sequencing of *cry1I* genes sequencing in a brazilian *Bacillus thuringiensis* isolates.** 2013. 79 p. Dissertação do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

ABSTRACT

The use of entomopathogenic bacteria such as *Bacillus thuringiensis*, as biological insecticides has proven one of the viable alternatives to the use of synthetic insecticides. The entomopathogenic activity is primarily attributable to the crystals parasporais, which are composed of one or more types of toxic proteins, such as Cry proteins, which shows specificity for different orders of insects. This work presents a review focusing on the description of *B. thuringiensis*, the mechanism of action of Cry proteins, *cry* genes and their classifications, an article presenting the to the cloning of a *cry* gene from *B. thuringiensis* BR145 and a third part comprising complementary results obtained for *B. thuringiensis* BR09. In this work, we used molecular techniques associated with bioinformatics tools, in order to obtain the complete sequence of a *cry* gene from of *B. thuringiensis* strains, aiming his subsequent cloning. One *B. thuringiensis* BR145 strain, isolated from soil, were selected by PCR using the degenerate primers. These strain were selected based on the genetic profile of *cry* genes. The *cry1I* gene was identified in these four strains. The obtained sequences were homologous to the central region of the gene. Therefore, new primers were chosen from the consensus regions, homologous to sequences of other *cry1I* genes, to obtain the complete sequences of the genes by using *primer walking* method. This study obtained the cloning of the full gene of the strains BR09 and BR145 and complete sequence of the gene of strain BR145.

Key words: *B. thuringiensis*. *Cry* genes *Cry1i*. *Primer walking* and cloning.

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Estrutura tridimensional de Cry1Aa.....	18
Figura 2 –	Alinhamento da estrutura primária das proteínas Cry	19
Figura 3 –	Modos de ação das toxinas Cry	21
Figura 4 –	Receptores moleculares da proteína Cry1Aa	22

Manuscrito

Figura 1.	Amplificação de genes <i>cry</i> por <i>primers degenerados</i>	48
Figura 2.	Representação da localização dos <i>primers</i> na extensão do gene <i>cry1la</i>	49
Figura 3.	Amplificação do fragmento inicial do gene <i>cry1la</i>	49
Figura 4.	Amplificação dos fragmentos clonados do gene <i>cry1la</i>	50
Figura 5.	Sequência de DNA do gene <i>cry1la</i> BR145 com sequência deduzida de aminoácidos	51
Figura 6.	Dendograma de similaridade genética de sequências do gene <i>cry1la</i> e BR145	55
Figura 7.	Representação dos três domínios das toxinas Cry1Ia1	56

Resultados Complementares

Figura 1.	Alinhamento da sequência parcial de nucleotídeos do gene <i>cry1la</i> da linhagem BR09.....	70
Figura 2.	Dendrograma de similaridade genética de sequência do gene <i>cry1la</i> e BR09	76
Figura 3.	Sequência de DNA do gene <i>cry1la</i> BR09 com sequência deduzida de aminoácidos.....	77

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Níveis de ranqueamento para classificação de genes *cry*25

Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados para obtenção do gene *cry1Ia*44

Anexos

Tabela 1. Indicações de mutações entre a sequência do gene *cry1Ia* da linhagem BR145 e demais sequências do gene *cry1I*62

Resultados complementares

Tabela 1. Indicações de mutações entre a sequência do gene *cry1Ia* da linhagem BR09 e demais sequências do gene *cry1Ia*73

ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aa	aminoácidos
Amp	Ampicilina
AMP	Adenosina monofosfato
APN	N-aminopeptidase
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
CADR	Glicoproteína caderina
C-terminal	Região carboxi terminal de uma proteína
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxiribonucleotídeo trifosfato
D.O	Densidade óptica
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetra-acético
g	Grama
<i>g</i>	Unidade de força centrífuga
GCR	Proteína glicoconjugada
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
h	Horas
Kb	Quilobase – 10 ³ pares de bases
kDa	Quilo Dalton
L	Litro
LB	Meio de cultura Luria-Bertani
LBagar	Meio de cultura Luria-Bertani sólido
LBamp	Meio de cultura Luria-Bertani com ampicilina
M	Molar
mg	Miligrama
min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensageiro
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanograma
N-terminal	Região amino-terminal de uma proteína
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PFT	Toxinas formadoras de poros
pH	Potencial hidrogeniônico
pM	Picomoles

rpm	Rotações por minuto
s	Segundos
T.A	Temperatura de anelamento
T.M	Temperatura de <i>melting</i>
Tris	Tri (hidroximetil) aminometano
TEB	Tris-borato EDTA
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
°C	Graus Celsius
σ	Fatores Sigma

ÍNDICE

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
1.1 <i>Bacillus thuringiensis</i>	15
1.2 δ-Endotoxinas ou Proteínas Cry	16
1.2.1 Mecanismo de ação das proteínas Cry	20
1.3 Genes <i>cry</i>	23
1.3.1 Regulação da Expressão Gênica	25
1.3.1.1 Genes <i>cry</i> dependentes de esporulação.....	26
1.3.1.2 Genes <i>cry</i> não-dependentes de esporulação.....	27
1.3.1.3 Mecanismos pós-transcricionais	27
1.3.2 <i>cry1I</i>	28
2. OBJETIVOS.....	30
3. REFERÊNCIAS	31
4. MANUSCRITO	
4.1 RESUMO	38
4.2 INTRODUÇÃO	39
4.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	41
4.3.1 Linhagens de <i>B. thuringiensis</i> e <i>Escherichia coli</i>	41
4.3.2 Extração de DNA genômico e plasmidial	42
4.3.3 Amplificação e clonagem do gene <i>cry1Ia</i>	43
4.3.4 Células competentes e transformação de <i>E. coli</i> DH10B.....	45
4.3.5 Sequenciamento de DNA e análise computacional das sequências	46
4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5. REFERÊNCIAS	57
ANEXOS.....	62
RESULTADOS COMPLEMENTARES	70

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis foi primeiramente descrito por Berliner em 1911 na Alemanha, isolado a partir de lagartas-da-traça de farinha *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) e classificada em 1915 como *B. thuringiensis* em homenagem a Thuringia (Alemanha) onde as lagartas foram coletadas; entretanto esta foi à primeira descrição, mas não o primeiro isolamento, que foi realizado por Sotō Ishiwata em 1901, no Japão, à partir de uma bactéria entomopatogênica presente em lagartas do bicho-da-seda *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) e denominada *Bacillus sotto* (Whiteley & Schnepf, 1986; Glare & O'Callaghan, 2000; Roh et al., 2007).

B. thuringiensis é uma bactéria Gram-positiva, pertencente à família *Bacillaceae*, a qual engloba a maioria das espécies formadoras de esporos. Sua célula vegetativa possui de 1,0 a 1,2 µm de largura por 3,0 a 5,0 µm de comprimento com flagelos peritríquios para mobilidade. Durante a esporulação, esporos elipsoidais e cristais são produzidos e localizam-se na região central ou paracentral no interior da célula-mãe correspondendo, o cristal, de 20% a 30% do peso seco das células (Lereclus et al., 1989; Arantes et al., 2002). A espécie é aeróbia não estrita com faixa de temperatura de crescimento entre 10 e 45°C. Ocorre naturalmente em ambientes diversos, entre eles, solos, filoplano de diferentes plantas, insetos e seus habitats e em grãos estocados.

A atividade inseticida do *B. thuringiensis* cabe principalmente aos cristais paraesporais produzidos durante o segundo estágio da esporulação e são liberados

quando ocorre a lise celular. Estes são compostos de um ou mais tipos de proteínas denominadas δ -endotoxinas ou proteínas Cry, entretanto a patogenicidade do *B. thuringiensis* também é atribuída a outros fatores de virulência que esta bactéria produz como hemolisinas, enterotoxinas, quitinases, fosfolipases, α -exotoxina, β -exotoxina e o próprio esporo (Bravo et al., 1998; Hansen & Salamitou, 2000; Vilas-Bôas et al., 2007; Vidal-Quist et al., 2009).

As inclusões proteicas apresentam os mais diversos formatos, entre eles, bipiramidais, cubóides, irregulares, circulares, ovóides, rombóides e suas características correlacionam-se com seu potencial inseticida e estão estritamente associados às classes de proteínas Cry, bem como ao inseto ou outros invertebrados. Cristais bipiramidais são frequentemente compostos por proteínas Cry1, e apresentam ação inseticida contra lepidópteros; cristais cubóides são frequentemente compostos por proteína Cry2 e associam sua ação contra lepidópteros e dípteros; rombóides associados a proteína Cry3 tóxicos para coleópteros, Cry4 para dípteros, enquanto que Cry5 e Cry6 apresentam ação inseticida para nematódeos (Roh et al., 2007).

1.2 δ -Endotoxinas ou Proteínas Cry

O cristal proteico existente no protoplasma celular de *B. thuringiensis* foi descoberto em 1953 por Hannay (Bravo et al., 2007). Estes cristais são responsáveis pela caracterização do *B. thuringiensis* e tem como principais constituintes as proteínas Cry e Cyt, codificadas por genes que se localizam com maior frequência nos plasmídios e menor frequência no cromossomo bacteriano (Vilas-Bôas et al., 2007).

Uma mesma linhagem de *B. thuringiensis* pode conter um único gene *cry* ou várias cópias de um mesmo gene *cry*, ou ainda vários genes *cry* diferentes, codificando a formação de diferentes proteínas Cry, que podem constituir uma ou mais inclusões proteicas. As proteínas são mantidas unidas e estáveis através de interações hidrofóbicas, pontes de hidrogênio e de dissulfeto e estas são responsáveis pela manutenção da estrutura, solubilização dos cristais e conservação dos aminoácidos nestas regiões (Gill et al., 1992; Martins, 2009). Devido à maioria dos genes *cry* ser localizada em plasmídeos conjugativos, possibilita-se a formação de linhagens com diversos perfis tóxicos (Capalbo et al., 2004).

A maior parte das proteínas que compõem as inclusões proteicas é sintetizada durante a fase de esporulação, sendo a transcrição da maioria dos genes *cry* dependente de fator sigma específico desta fase. Uma pequena parte, no entanto, são expressos também durante o crescimento vegetativo. Independente da expressão de genes *cry* ocorrer na esporulação ou na fase vegetativa a proteína Cry é fruto do metabolismo secundário (Arantes et al., 2002).

O peso molecular das proteínas Cry varia entre 40 e 140 kDa, cujas estruturas tem duas porções compostas por protoxinas: uma região amino-terminal variável que está associada a toxicidade da proteína e uma região carboxi-terminal conservada que se associa à formação das inclusões proteicas (Bravo et al., 2007).

A estrutura tridimensional da proteína Cry (Figura 1) é formada por três domínios I, II e III. A porção amino-terminal domínio I, é formada por cadeias polipeptídicas compostas por sete α -hélice antiparalelas, sendo uma central e hidrofóbica ($\alpha 5$) e outras seis cadeias anfipáticas ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 6$ e $\alpha 7$). Este domínio é responsável pela inserção na membrana e formação do poro. O domínio II

da porção amino-terminal é composto por três folhas β -pregueadas e duas α -hélices curtas, enquanto o domínio III da porção carboxi-terminal apresenta estrutura tipo β -sanduíche que confere a especificidade de ligação aos receptores celulares bem como o domínio II e a estabilidade estrutural da proteína, protegendo-a de degradação durante a proteólise (de Maagd et al., 2001; Arantes et al., 2002; Bravo et al., 2007; Roh et al., 2007).

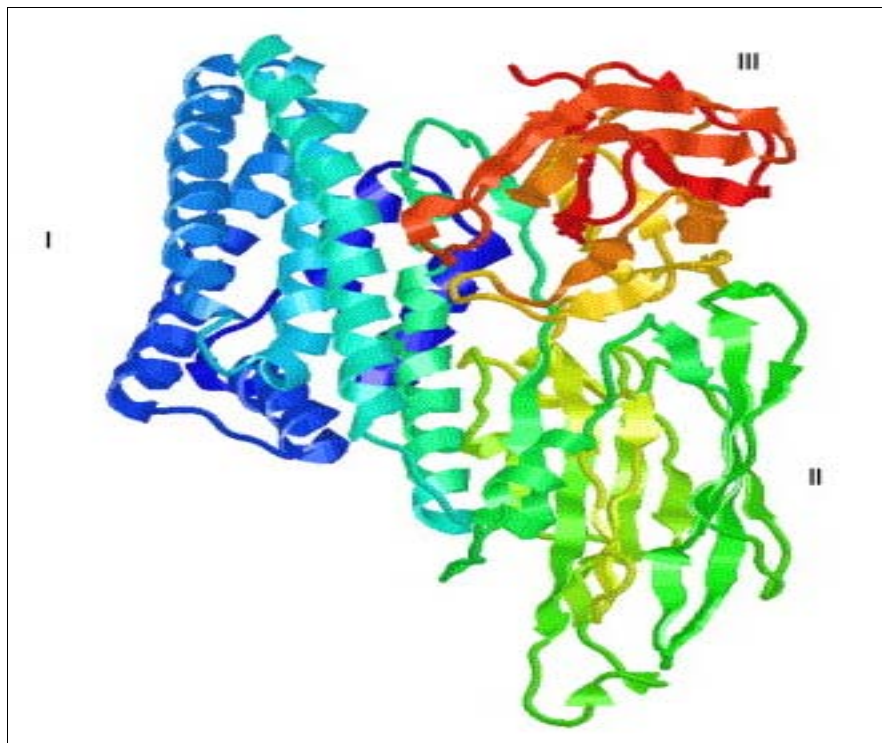


Figura 1 – Estrutura tridimensional da proteína Cry1Aa com os três domínios (de Maagd; Bravo; Crickmore, 2001).

Além das estruturas das proteínas Cry serem semelhantes, estas apresentam regiões homólogas entre si. Cinco blocos de aminoácidos conservados foram encontrados na maioria das sequências. Essas regiões conservadas são frequentemente observadas em porções internas das proteínas e nas regiões de contato entre domínios, porém não obrigatórias, uma vez que algumas proteínas Cry não apresentam um ou mais blocos, como é o caso da Cry21, a qual não apresenta o bloco 3 (Figura 2), sugerindo que esses blocos possam estar relacionados com a

estabilidade e a função destas proteínas (de Maagd et al., 2001; Capalbo et al., 2004; Pigott & Ellar, 2007).

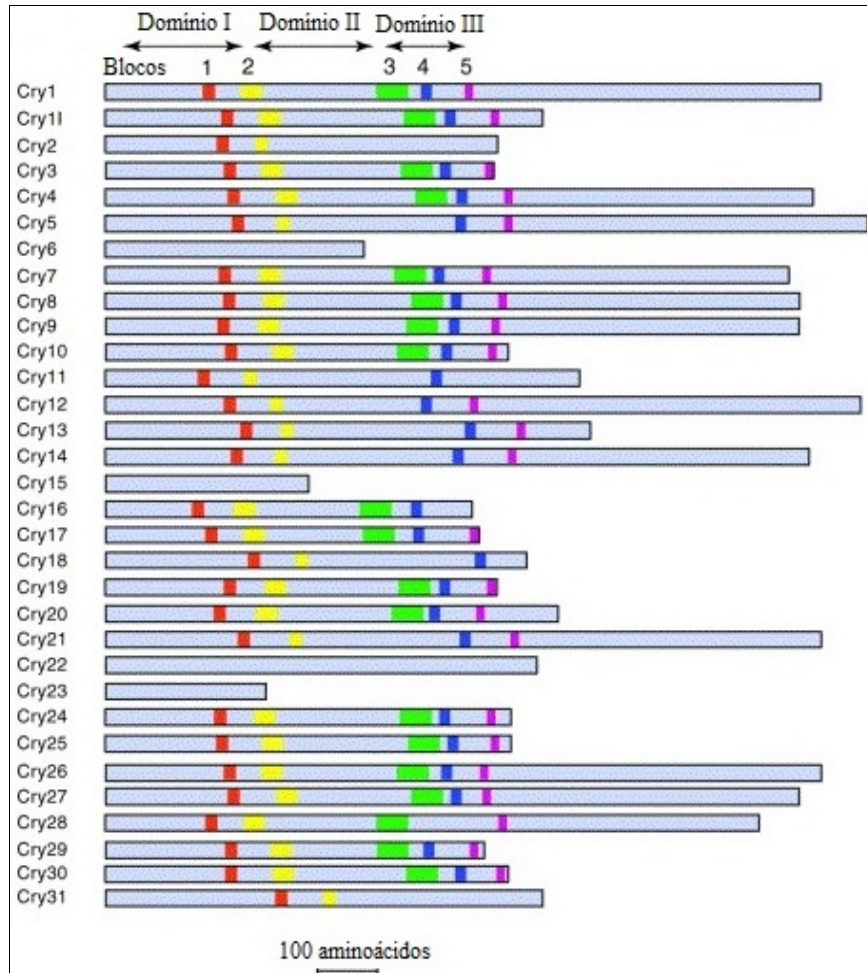


Figura 2 – Alinhamento da estrutura primária das Proteínas Cry. Os retângulos coloridos correspondem às sequências conservadas. Domínios I, II e III correspondem à toxina ativa (adaptada de Maagd; Bravo; Crickmore, 2001).

Os critérios para classificação destas proteínas foram estabelecidos em 1998, por um comitê de pesquisadores que propuseram uma nova classificação das proteínas Cry, baseada somente na sequência de aminoácidos, não levando em consideração o perfil de toxicidade, como a classificação anterior, proposta em 1989 por Höfte e Whiteley.

1.2.1 Mecanismo de ação das proteínas Cry

Dois modelos de ação têm sido propostos para descrever a atividade das proteínas Cry. O primeiro deles descrevem as proteínas Cry como pertencentes a uma classe de toxinas conhecidas como toxinas formadoras de poros (PFT), que são secretadas como proteínas solúveis em água, e alteram suas conformações para se inserir ou atravessar a membrana celular de seu hospedeiro, ligando-se a receptores específicos encontrados nas microvilosidades do intestino médio dos insetos ocasionando sua morte (Soberón et al., 2006; Bravo et al., 2007). O segundo modelo proposto, sugere que as proteínas que compartilham os três domínios não são formadoras de poros, mas ativam uma cascata sinalizadora através da interação das proteínas Cry com a caderina que atua como um receptor específico (Zhang et al., 2005; Bravo & Soberón, 2008).

O modelo de ação designado “formação de poros” (Figura 3) parece ser o mais comum entre as diferentes Ordens de insetos (Diptera, Lepidoptera e Coleoptera). O intestino médio da maioria das larvas de insetos que são susceptíveis às proteínas Cry apresentam, entre outras características, pH alcalino alto. Contudo, algumas exceções são vistas em Cry3A que é clivada tanto em pH ácido quanto alcalino (Koller et al., 1992). Após a infecção natural, que ocorre por ingestão dos cristais, estes serão solubilizados no intestino do inseto, sendo liberadas as protoxinas por clivagem realizadas por proteases específicas (Barusrux et al., 2003; Capalbo et al., 2005) resultando em toxinas ativas com cerca de 60 a 70% do tamanho da protoxina.

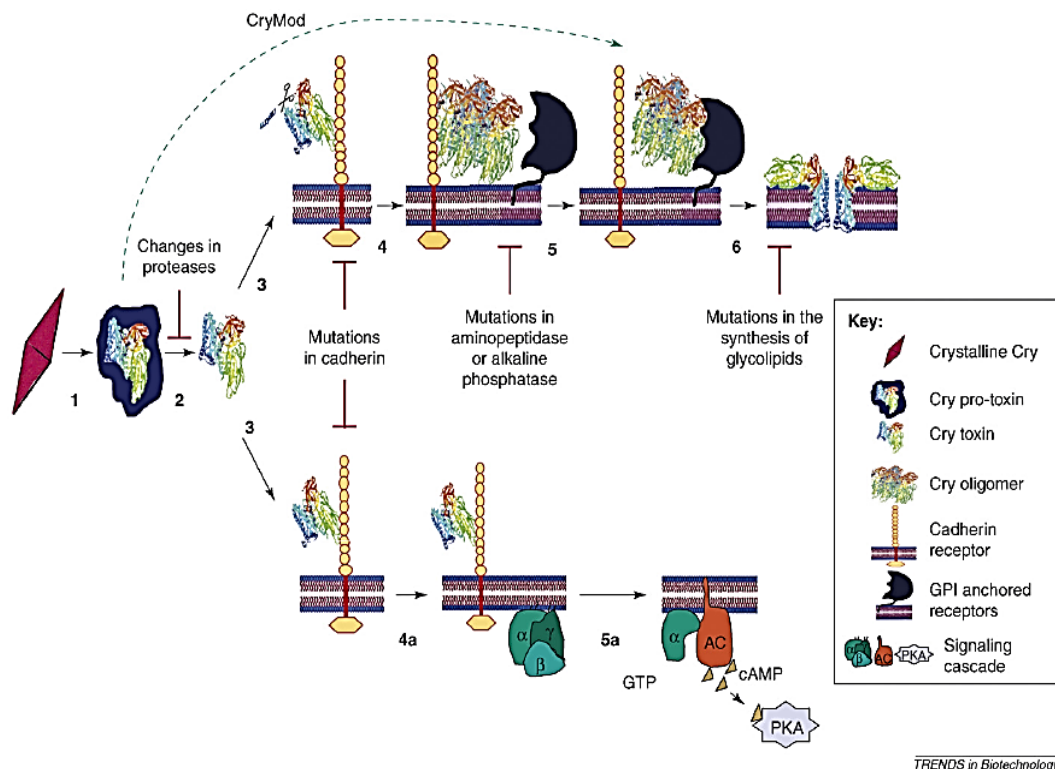


Figura 3 – Modelos do modo de ação das toxinas Cry: modelo de formação do poro (acima) e modelo de transdução de sinal (abaixo) (Bravo et al., 2007).

Quatro diferentes proteínas tem sido identificadas como receptoras de proteínas Cry: uma N-aminopeptidase (APN) que está ancorada à membrana por um glicosilfosfatidilinositol (GPI) e com capacidade de ligação à proteínas Cry, como no caso da proteína Cry1Ac, uma glicoproteína caderina (CADR) também com capacidade de ligação à proteínas Cry, entre elas Cry1Ab, uma proteína glicoconjugada (GCR) e uma fosfatase alcalina (ALP) que também se encontra ancorada a GPI (Figura 4). Em adição, glicolípídeos de insetos também têm sido considerados como receptores em nematódeos (Roh et.al., 2007; Bravo et al., 2007; Hernández-Martínez et al., 2010).

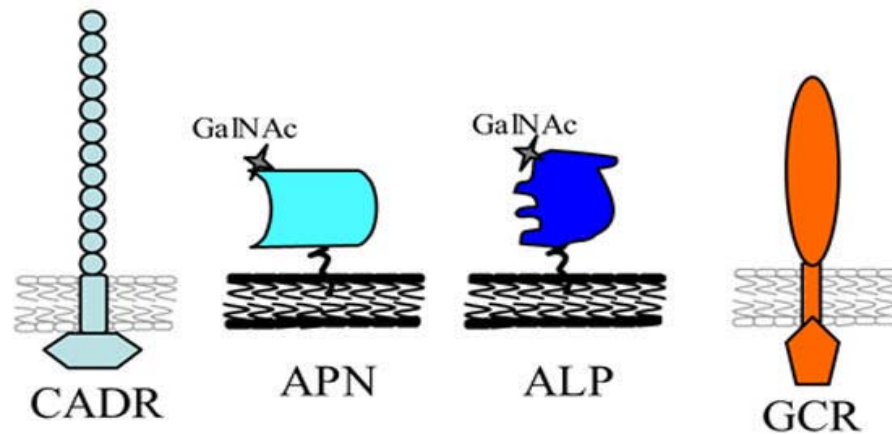


Figura 4 – Receptores moleculares da proteína Cry1Aa. CADR (caderina); APN (N-aminopeptidase); ALP (fosfatase alcalina) e GCR (glicoconjugado de 270kDa) (Bravo et al., 2007).

A toxina ativa é capaz de ligar-se a receptores específicos presentes nas células das microvilosidades intestinais do inseto (Bravo et al., 2007; Roh et al., 2007). A ligação da toxina com receptores específicos leva a formação de oligômeros de toxinas, os quais ligam-se a receptores secundários da célula intestinal. Desta forma, ocorre a inserção da toxina oligomérica na membrana epitelial intestinal resultando em poros nesse epitélio (Bravo et al., 2007).

O outro modelo, mais atual, é denominado “transdução de sinal” (Figura 3) e foi estudado em apenas poucos insetos-alvos. Segundo esse modelo, a ligação que ocorre entre a proteína Cry e os receptores específicos, induz reações intracelulares envolvendo a proteína G e a adenilato ciclase, resultando no aumento da concentração de adenosina monofosfato (AMP) cíclico intracelular e ativação da proteína quinase A. Todas essas consequências levam a um desequilíbrio da pressão interna celular, danificando-a (Bravo & Soberón, 2008).

Assim, as proteínas Cry causam a morte das células epiteliais por inativação do sistema de controle de gradiente de pH e citólise osmótica. Estas proteínas provocam alterações na permeabilidade das microvilosidades levando a lise celular

e a proliferação de bactérias na hemolinfa, ocasionando a morte por septicemia (Bravo et al., 2007).

Independente do modo de ação, ocorre morte das células do intestino médio do inseto e consequente paralisia do aparelho digestivo do mesmo. Em alguns casos a larva morre por inanição, provocada pela paralisia geral dos músculos, prejudicando a respiração do inseto ou pela germinação dos esporos na luz do aparelho digestivo e multiplicação das células vegetativas levando o inseto à morte por septicemia (Habib & Andrade, 1986; Bravo et al., 2007; Bravo & Soberón, 2008; Vallete-Gely et al., 2008).

1.3 Genes *cry*

PCR pode ser considerada uma ferramenta para predizer sobre a atividade entomopatogênica de *B. thuringiensis*. Esta técnica foi primeiro introduzida por Carozzi e colaboradores (1991) para identificar genes e predizer a atividade inseticida para as ordens Lepidoptera, Diptera e Coleoptera. Desde a última década, a técnica de PCR continua sendo utilizado para a prospecção de genes *cry* presentes em coleções de *B. thuringiensis* entre os quais *cry1* e *cry3* (Cerón et al., 1995), *cry1*, *cry2*, *cry3*, *cry4*, *cry7* e *cry8* (Ben Dov et al., 1997), *cry1*, *cry3*, *cry5*, *cry7*, *cry8*, *cry9*, *cry11*, *cry12*, *cry13*, *cry14* e *cry21* (Bravo et al., 1998), *cry1Aa*, *cry2Aa*, *cry3Aa*, *cry4Aa*, *cry7Aa*, *cry8Ca*, *cry9Aa* e *cry11Aa* (Berón et al., 2005).

Os genes *cry* geralmente estão localizados em plasmídios conjugativos de alto peso molecular ocorrendo eventualmente no cromossomo ou em ambos, entretanto ainda não foi elucidado se os genes presentes nos cromossomos contribuem para a formação da inclusão proteica (Schnepf et al., 1998). Uma

linhagem de *B. thuringiensis* pode conter uma ou várias cópias de um mesmo gene *cry* ou diferentes genes *cry* responsáveis pela síntese de diferentes proteínas entomopatogênicas (Lereclus et al., 1993; Arantes et al., 2002). Estes genes apresentam mobilidade devido a associação com sequências de inserção (IS) e transposons (Mahillon et al., 1994) e somado ao fato desses genes estarem presentes, preferencialmente, em plasmídios conjugativos pode explicar a diversidade destes genes e as diferentes combinações deles, o que resulta em cristais proteicos com diferentes tipos de proteínas Cry e com perfis de toxicidade distintos (Arantes et al., 2002; Pérez, 2004; Pigott & Ellar, 2007).

A funcionalidade dos elementos de transposição em *B. thuringiensis* não está ainda bem definida mas postula-se que estes podem estar envolvidos mediando a transferência de plasmídios através da formação de estruturas cointegradas entre os próprios plasmídios conjugativos e DNA cromossomal ou plasmídios não conjugativos mas estes favorecem a transferência horizontal do material genético entre *B. thuringiensis* e *Bacillus cereus* (Schnepf et al., 1998).

Atualmente são descritas mais de 662 proteínas Cry classificadas em 72 classes com subdivisões (Cry1 a Cry72). As atualizações podem ser acompanhadas pelo site http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt.

A nomenclatura atual baseada apenas na identidade de aminoácidos permite que as toxinas intimamente relacionadas possam ser classificadas removendo a necessidade de realização de bioensaios para cada nova toxina contra uma série de organismos (Crickmore et al., 2013).

A similaridade entre os genes pode ser verificada utilizando a ferramenta BLAST disponível em <http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov>. A classificação dos genes *cry* apresentam quatro ranques hierárquicos que inclui números e letras (maiúsculas

e minúsculas). Genes *cry* que apresentam cerca de 45% de homologia em sua sequência são agrupados no primeiro ranque, como exemplo *cry1*. Quando apresentam 78% de identidade vão constituir o segundo ranque, exemplo disso *cry1A*, e o terceiro ranque com 95% de identidade, como exemplo *cry1Aa*. Para o quarto ranque, a identidade deve ser maior que 95%, como exemplo os genes *cry1Aa1* e *cry1Aa2* que apresentam 99% de identidade (Crickmore et al., 1998).

Tabela 1 – Representação esquemática dos ranques para a classificação dos genes *cry*.

Níveis de ranqueamento				
	Primário	Secundário	Terciário	Quaternário
<i>cry</i>	1	A	a	1
	≤ 45%	≤ 78%	≤ 95%	> 95%
	<i>cry1</i> → <i>cry2</i>	<i>cry1A</i> → <i>cry1B</i>	<i>cry1Aa</i> → <i>cry1Ab</i>	<i>cry1Aa1</i> → <i>cry1Aa2</i>

1.3.1 Regulação da Expressão Gênica

Uma característica comum aos genes *cry* é sua expressão ocorrer durante a fase de esporulação e a relação entre os níveis de expressão e esporulação são coordenadas pelos vários mecanismos transcricionais, pós-transcricionais e pós-traducionais (Schnepf et al., 1998). Entretanto, algumas classes de genes *cry* se expressam na fase vegetativa (Sekar et al., 1987), sendo assim estes genes são classificados em dependentes de esporulação e não-dependentes de esporulação.

1.3.1.1 Genes *cry* dependentes de esporulação

B. thuringiensis prontamente prolifera quando as condições ambientais como temperatura e disponibilidade de nutrientes são favoráveis enquanto que a formação de esporos é desencadeada por fatores internos e externos que incluem sinalização para a escassez de nutrientes, densidade celular e progressão do ciclo celular (Hilbert & Piggot, 2004). Extensivos estudos sobre a esporulação de *B. subtilis* forneceram dados sobre o complexo mecanismo de controle temporal e espacial no processo de diferenciação e estes apresentam funções semelhantes em *B. thuringiensis* como os fatores σ (Adams et al., 1991; Agaisse & Lereclus, 1995).

O ciclo de vida de *B. thuringiensis* pode ser dividido em quatro fases: fase I – crescimento vegetativo, fase II – transição para a esporulação, fase III – esporulação e fase IV – maturação do esporo e lise celular (Hilbert & Piggot, 2004).

A regulação do mecanismo de esporulação ocorre em nível transcricional por ativação de seis fatores σ que se ligam sucessivamente a RNA polimerase direcionando a transcrição e determinando quais promotores específicos da esporulação serão reconhecidos (Agaisse & Lereclus, 1995; Schnepf et al., 1998).

Estes fatores são compostos pelo fator σ^A que é o fator ativo durante a fase vegetativa e cinco outros fatores (σ^H , σ^F , σ^E , σ^G e σ^K) que aparecem nessa ordem e são regulados temporalmente durante a esporulação. Os fatores σ^A e σ^H são ativos na célula pré-divisional, σ^E e σ^K ativos na célula-mãe e σ^F e σ^G estão ativos no pré-esporo (Agaisse & Lereclus, 1995)

1.3.1.2 Genes *cry* não-dependentes de esporulação

O gene *cry3Aa* é expresso durante a fase vegetativa, podendo ser expresso em menores concentrações na fase estacionária (Schnepf et al., 1998). Casos como este do gene *cry3Aa* são exemplos de genes não-dependentes de esporulação.

Segundo Agaisse & Lereclus (1995), análises com fusões transcricionais de *lacZ* indica que a cinética de expressão entre *cry3A* e *cry1Aa* são diferentes e a fusão *lacZ-cry3a* não é dependente dos fatores sigmas σ^E e σ^K como em outros genes *cry* mas reconhece o fator σ^A (Agaisse & Lereclus, 1994; Agaisse & Lereclus, 1995). O promotor *cry3A* é fracamente mas significativamente expresso durante a fase vegetativa de crescimento e é ativado no final da fase exponencial permanecendo até t_8 da fase de esporulação (Agaisse & Lereclus, 1995).

1.3.1.3 Mecanismos pós-transcricionais

A taxa de degradação do mRNA tem consequências importantes na expressão de um gene e devido a isso é necessário que moléculas de mRNA sejam estáveis para se ter proteínas altamente expressas. Glatron e Rapoport (1972) demonstraram que mRNAs que codificam as proteínas Cry estão entre os mRNAs longa vida com uma meia-vida em torno de dez minutos, o que é pelo menos cinco vezes maior do que a meia-vida de mRNA bacteriano em geral.

A estabilidade dos mRNAs é determinada por partes das regiões não-traduzidas e classificadas em dois grupos – 3' mRNA ou 5' estabilizadora mRNA - de acordo com sua localização no mRNA.

A extremidade 3' do mRNA atua como um retro-regulador positivo e é um possível terminador transcricional contendo sequências repetidas invertidas que protege o mRNA da degradação por exonucleases 3' – 5' e a fusão deste fragmento com outro 3' de genes heterólogos aumentam a meia-vida de seus transcritos e com isso os níveis de expressão (Agaisse & Lereclus, 1995).

Outro determinante da estabilidade é a sequência consenso Shine-Dalgarno e que está presente na extremidade 5' do mRNA. Essa estabilidade ocorre devido a interações desta região com a extremidade 3' do rRNA 16S. A ligação entre a subunidade 30S do ribossomo e a sequência Shine-Dalgarno presente na extremidade 5' não-traduzida protege o mRNA de ribonucleases com atividade 5' – 3' resultando na estabilidade do transcrito correspondente (Agaisse & Lereclus, 1995).

1.3.2 *cry1I*

O gene *cry1Ia* foi primeiro caracterizado e clonado por Tailor e colaboradores em 1992 e, anteriormente, na classificação proposta por Crickmore et al. (1998) era definido como *cryV*. Atualmente são cerca de 50 genes *cry1I* agrupados em 7 subclasses (Crickmore et al., 2012).

Segundo Crickmore et al. (1998) genes designados como *cry1Ia* quando expressos em *Escherichia coli* codificam uma proteína com 719 aminoácidos e massa de 81 kDa (Tailor et al., 1992; Tounsi et al., 2003).

Segundo Tailor et al. (1992), o gene *cry1Ia* exibe atividade entomopatogênica contra lepidópteros e coleópteros, mas, posteriormente, outros trabalhos relataram que não houve ação deste gene contra coleópteros, mas somente contra

lepidópteros (Choi et al., 2000; Song et al., 2003; Tounsi et al., 2003; Escudero et al., 2006).

As proteínas Cry1Ia não se acumulam em cristais como as outras proteínas Cry, pois são secretadas no início da fase de esporulação (Tounsi et al., 2003; Escudero et al., 2006). Segundo Kostichka et al. (1996) e Song et al. (2003), é secretada devido a presença da região N-terminal do domínio I atuando como um peptídeo sinal.

Alguns genes *cry1I*-type estão localizados aproximadamente 500 pb a jusante de outros genes *cry1* (Kostichka et al., 1996; Escudero et al., 2006) e são silenciados em linhagens selvagens. Isto pode ser explicado pela estrutura incompleta desses genes como a falta de sequências promotoras e pela presença de um terminador transcricional presente no intervalo entre as sequências dos genes *cry1* – *cry1I* (Song et al., 2003; Li-Ming et al., 2008). Em contraste, Tounsi et al. (2003), mostraram, através de análises de bioinformática da região 5' do gene *cry1Ia* presente na linhagem BNS3, a presença de uma região –35 e –10 que são homólogas às do gene *cry4A*. Neste mesmo trabalho, Tounsi e colaboradores (2003) identificaram um ponto de início de transcrição 119 a montante do códon de início de tradução.

Assim, esse trabalho visa a obtenção da sequência nucleotídica completa de um gene *cry1I* de um isolado brasileiro de *B. thuringiensis*, bem como sua caracterização.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Esse trabalho visa a obtenção da sequência nucleotídica completa de um gene *cry1I* de um isolado brasileiro de *B. thuringiensis* e sua posterior clonagem em *E. coli* bem como sua caracterização.

2.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar a presença do gene *cry1I* em isolados brasileiros de *B. thuringiensis*;
- Desenvolver oligonucleotídeos específicos para a obtenção da sequência completa desse gene;
- Obter a sequência completa de um gene *cry1I* de um isolado brasileiro de *B. thuringiensis*;
- Caracterizar esse mesmo gene, identificando domínios funcionais e realizando análises comparativas da sequência completa do mesmo com sequências de outros genes *cry1I* depositadas em banco de dados.

3. REFERÊNCIAS

- ADAMS, L.F.; BROWN, K.L.; WHITELEY, H.R. Molecular cloning and characterization of two genes encoding sigma factors that direct transcription of *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene promoter. **Journal of Bacteriology**, 173: 3846 – 3854, 1991.
- AGAISSE, H.; LERECLUS, D. Expression in *Bacillus subtilis* of the *Bacillus thuringiensis cryIIIa* toxin gene is not dependent on a sporulation-specific sigma factor and is increased in a *spo0A* mutant. **Journal of Bacteriology**, 176: 4734–4741, 1994.
- AGAISSE, H.; LERECLUS, D. How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein? **Journal of Bacteriology**, 177: 6027 – 6032, 1995.
- ARANTES, O. M. N.; VILAS-BÔAS, L. A.; VILAS-BÔAS, G. F. L. T. *Bacillus thuringiensis*: estratégias no controle biológico. In: SERAFINE, L.A; BARROS, N. M; AZEVEDO, J. L. (Org.). **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. Caxias do Sul: Agropecuária, 2002. p. 269 – 293.
- BARUSRUX, S., SRAMAL, I., KATZENMEIER, G., BUNYARATVEJ, A., PANYIM, S., ANGSUTHANASOMBAT, C. Ex vivo cytotoxicity of the *Bacillus thuringiensis* cry4B δ -endotoxin to isolated midguts of *Aedes aegypti* larvae. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, 36 (3): 294 – 298, 2003.
- BEN DOV, E.; ZARISTKY, A.; DAHAN, E.; BARAK, Z.; SINAI, R.; MANASHEROB, R.; KHAMRAEV, A.; TROITSKAYA, E.; DUBIRSKY, A.; BEREZINA, N.; MARGALITH, Y. Extended Screening by PCR for Seven *cry*-Group Genes from Field-Collected Strains of *Bacillus thuringiensis*. **Applied Environmental Microbiology**, 63 (12): 4883 – 4890, 1997.
- BERÓN, C.M., CURATTI, L., and SALERNO, G. New strategy for identification of novel *cry*-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains. **Applied Environmental Microbiology**, 71 (2): 761 – 765, 2005.
- BRAVO, A., SARABIA, S., LOPEZ, L., ONTIVEROS, H., ABARCA, C., ORTIZ, A., ORTIZ, M., LINA, L., VILLALOBOS, F.J., PEÑA, G., NUÑEZ-VALDEZ, M.E., SOBERÓN, M., and QUINTERO, R. Characterization of *cry* genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied Environmental Microbiology**, 64 (12): 4965 – 4972, 1998.
- BRAVO, A.; GILL, S.S.; SOBERÓN, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, 49, 423 – 435, 2007.
- BRAVO, A.; SOBERÓN, M. How to cope with insect resistance to Bt toxins?. **Trends in Biotechnology**, 26 (10): 573 – 579, 2008.

CAPALBO, D. M. F.; VILAS-BÔAS, G. T.; ARANTES, O. M. N. *Bacillus thuringiensis*: formulações e plantas transgênicas. In: BORÉM, A. (Ed.) **Biotecnologia e meio ambiente**. Viçosa: Folha de Viçosa, 2004. p. 309-350.

CAPALBO, D. M.; VILAS-BÔAS, G. T.; ARANTES, O. M.; SUZUKI, M. T. *Bacillus thuringiensis*. **Revista Biotecnologia, Ciências e Desenvolvimento**, 34, 78 – 84, 2005.

CAROZZI, N.B.; KRAMER, V.C.; WARREN, G.W.; EVOLA, S.; KOZIEL, M.G. Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. **Applied Environmental Microbiology**, 57 (11): 3057, 1991.

CERÓN, J.; ORTÍZ, A.; QUINTERO, R.; GUERECA, L.; BRAVO, A. Specific PCR Primers Directed to Identify *cryI* and *cryIII* Genes within a *Bacillus thuringiensis* Strain Collection. **Applied Environmental Microbiology**, 61 (11): 3826 – 3831, 1995.

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

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D. R.; FEITELSON, J.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; DEAN, D. H. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 62: 807 – 813, 1998.

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D. R.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; BRAVO, A.; DEAN, D. H. ***Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature**. Disponível em <http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/>. Acesso em: fev. 2013.

de MAAGD, R. A. DE; BRAVO, A.; CRICKMORE, N. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. **Trends in Genetics**, 17, 193 – 199, 2001.

ESCUADERO, I.R.; ESTELA, A.; PORCAR, M.; MARTÍNEZ, C.; OGUIZA, J.A.; ESCRICHE, B.; FERRÉ, J.; CABALLERO, P. Molecular and Insecticidal Characterization of a Cry1I Protein Toxic to Insects of the Families Noctuidae, Tortricidae, Plutellidae and Chrysomelidae. **Applied Environmental Microbiology**, 4796-4804, 2006.

GILL, S.S.; COWLES, E.A.; PIETRANTONIO, P.V. The Mode of Action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. **Annual Reviews Entomology**, 37, 617 – 636, 1992.

GLARE, T.R.; O'CALLAGHAN, M. ***Bacillus thuringiensis*: Biology, Ecology and Safety**. Wiley & Sons, 2000.

GLATRON, M. F.; RAPOPORT, G. Biosynthesis of the parasporal inclusion of *Bacillus thuringiensis*: half-life of its corresponding messenger RNA. **Biochimie** 54:

1291 – 1301, 1972.

HABIB, M. E. M.; ANDRADE, C. F. S. Bactérias entomopatogênicas. In: ALVES, S. B. (Coord.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: Manole, 1986. p. 130-140.

HANSEN, B. M.; SALAMITOU, S. Virulence of *Bacillus thuringiensis*. In: CHARLES, J. F. DELÉCLUSE, A.; M NIELSEN-LE ROUX, C. (Ed.). **Entomopatogenic bacteria: from laboratory to field application**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 41 – 64.

HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, P. NAVARRO-CERRILLO, G., CACCIA, S., MAAGD, R. A., MOAR, W. J., FERRÉ, J., ESCRICHE, B., HERRERO, S. Constitutive activation of the midgut response to *Bacillus thuringiensis* in Bt-resistant *Spodoptera exigua*. **PLoS ONE** 5(9), 2010.

HILBERT, D.W.; PIGGOT, P.J. Compartmentalization of Gene Expression during *Bacillus subtilis* Spore Formation. **Microbiology and Molecular Biology Review**, 68 (2): 234 – 262, 2004.

HÖFTE, H.; WHITELEY, H. R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiology Review**, 53, 242 – 255, 1989.

KOLLER, C.N.; BAUER, L.S.; HOLLINGWORTH, R.M. Characterization of the pH-mediated solubility of *Bacillus thuringiensis* var. *san diego* native δ -endotoxin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 184 (2): 692 – 699, 1992.

KOSTICHKA, K.; WARREN, G.W.; MULLINS, M.; MULLINS, A.D.; CRAIG, J.A.; KOZIEL, M.G.; ESTRUCH, J.J. Cloning of a *cryV*-type Insecticidal Protein Gene from *Bacillus thuringiensis*: the *cryV*-Encoded Protein Is Expressed Early in Stationary Phase. **Journal of Bacteriology**, 178 (7): 2141 – 2144, 1996.

LERECLUS, D.; BOURGOUIN, C.; LECADET, M.M.; KLIER, A.; RAPOPRT, G. Role, structure and molecular organization of the genes coding for the parasporal δ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis*. In: SMITH, I.; SLEPECKY, R.A.; SETLOW, P. (eds) **Regulation of prokaryotic development: structural and functional analysis of bacterial sporulation and germination**. Washington: American Society for Microbiology. 1989. p.255 – 276.

LERECLUS, D.; DELÉCLUSE, A.; LECADET, M.M. Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. In: ***Bacillus thuringiensis*, An Environmental biopesticide: Theory and practice**. Enwistle P.F.; Cory, J.S.; Bailey, M.J. and Higgs S. (eds) John Wiley & Sons Ltda. West Sussex, England, 1993. p.37 – 69.

LI-MING, D.; LAN-LAN, H.; ZHANG, J.; KANG-LAI, H.; KUI-JUN, Z.; DA-FANG, H.; FU-PING, S. Cloning, expression and activity of *cry1Ia* gene from *Bacillus thuringiensis* isolate. **Chinese Journal of Agricultural Biotechnology** 5 (1): 49 – 53, 2008.

- MAHILLON, D. J.; REZSOHHAZY, R.; HALLET, B.; DELCOUR, J. IS231 and other *Bacillus thuringiensis* transposable elements: a review. **Genetica**, 93: 13 – 26, 1994.
- MARTINS, E.S. **Estudo da atividade de proteínas Cry derivadas de *Bacillus thuringiensis* ativas para insetos-praga do algodoeiro**. 2009. Tese de Doutorado – Universidade de Brasília – UnB, 2009.
- PÉREZ, V.J. Genética y Biología Molecular de *Bacillus thuringiensis*. In: BRAVO, A.; CERÓN, J. (Ed) ***Bacillus thuringiensis* en el control biológico**. Bogotá: Colombia, 2004. p.207 – 232.
- PIGOTT, C.R.; ELLAR, D.J. Role of Receptors in *Bacillus thuringiensis* Crystal Toxin Activity. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 71, 255 – 281, 2007.
- ROH, J.Y., CHOI, J.Y., LI, M.S., JIN, B.R., and JE, Y.H. *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe and effective tool for insect pest control. **Journal of Microbiology Biotechnology**,. 17: 547 – 559, 2007.
- SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology Molecular Biology**, 62, 775 – 806, 1998.
- SEKAR, V.; THOMPSON, D.V.; MARONEY, M.J.; BOOKLAND, R.G.; ADANG, M.J. Molecular cloning and characterization of the insecticidal crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. **Proceedings of the National Academic of Science**, .84: 7036 – 7040, 1987.
- SOBERÓN, M.; FERNÁNDEZ, L.;PÉREZ, C.; GILL, S.; BRAVO, A. Mode of action of mosquitoicidal *Bacillus thuringiensis* toxins. **Toxicon**. 03, 2006.
- SONG, F.P.; ZHANG, J.; GU. A.X. Identification of *cry1I*-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains and characterization of a novel *cry1I*-type gene. **Applied Environmental Microbiology**, 69 (9): 5207 – 5211, 2003.
- TAILOR, R.; TIPPETT, J.; GIBB, G.; PELLIS, S.; JORDAN, L.; ELY, S. Identification and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin entomocidal to coleopteran and lepidopteran larvae. **Molecular Microbiology**, 6, 1211 – 1217, 1992.
- TOUNSI, S.; ZOUARI, N. JAOUA, S. Cloning and study of the expression of a novel *cry1Ia*-type gene from *Bacillus thuringiensis* subs. *kurstaki*. **Journal of Applied Microbiology**, 95, 23 – 28, 2003.
- VALLETE-GELLY, I.; LEMAITRE, B.; BOCCARD, F. Bacterial strategies to overcome insect defenses. **Nature Reviews: Microbiology**, 6 (4): 302 – 313, 2008.
- VIDAL-QUIST, J.C., CASTAÑERA, P., GONZÁLEZ-CABRERA, J. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains isolated from citrus orchards in Spain and evaluation of their insecticidal activity against *Ceratitidis capitata*. **Journal of Microbiology**

Biotechnology, 19: 749 – 759, 2009.

VILAS-BÔAS, G. T.; PERUCA, A. P. S.; ARANTES, O. M. N. Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis* and *Bacillus thuringiensis*. **Canadian Journal of Microbiology**, 53 (1):. 673 – 687, 2007.

WHITELEY, H.R.; SCHNEPF, H.E. The molecular biology of parasporal crystal body formation in *B. thuringiensis*. **Annual Review of Microbiology**, 40, 549 – 576, 1986.

ZHANG, X.; CANDAS, M.; GRIKO, N. B.; ROSE-YOUNG, L.; BULLA, L. A. JR. Cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin depends of specific binding the toxin cadherin receptor BT-R1 expressed in insect cells. **Cell Death and Differentiation**, n. 12, 1407 – 1416, 2005.

4. Manuscrito

**IDENTIFICAÇÃO, CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DE GENES *cry1I* DE
ISOLADOS BRASILEIROS DE *Bacillus thuringiensis***

Manuscrito a ser submetido à publicação em periódico Internacional

**IDENTIFICATION, CLONING AND SEQUENCING OF *cry1I* GENES IN
BRAZILIAN *Bacillus thuringiensis* ISOLATES**

Ricieto, A.P.S.¹; Fazon, F.A.P.¹; Berón, C.²; Vilas-Boas, L.A.¹; Vilas-Bôas, GT¹

¹*Departamento de Biologia Geral, CCB, Universidade Estadual de Londrina, CP 6001,
86051-990, Londrina/PR, Brazil*

²*Centro de Estudios de Biodiversidad y Biotecnología de Mar del Plata (CEBB-CIB-FIBA),
Argentina*

Keywords

B. thuringiensis, cry genes, cry1I, primer walking and cloning

Corresponding author

*Gislayne T. Vilas-Bôas, Departamento de Biologia Geral, CCB, Universidade Estadual de
Londrina, CP 6001, 86051-990, Londrina/PR, Brazil. Phone: +55 (43) 3371-4527; Fax: +55
(43) 3328-4440; e-mail: gvboas@uel.br*

4.1 RESUMO

O uso de bactérias entomopatogênicas como o *Bacillus thuringiensis*, como inseticidas biológicos tem se mostrado uma das alternativas viáveis ao uso de inseticidas sintéticos. A atividade entomopatogênica é atribuída principalmente aos cristais paraesporais, os quais são compostos por um ou mais tipos de proteínas tóxicas, como as Cry que possuem especificidade para insetos de diferentes ordens. Neste trabalho, foram utilizadas técnicas moleculares associadas às ferramentas de bioinformática visando à obtenção da sequência completa de um gene *cry* de uma linhagem de *B. thuringiensis* e sua posterior clonagem. A linhagem de *B. thuringiensis* BR145, isolada de solo, foi selecionada por PCR através de iniciadores degenerados. O gene *cry1I* foi identificado nessa linhagem. As sequências obtidas foram homólogas a região central do gene. Sendo assim, novos iniciadores foram selecionados à partir de regiões consenso, homólogas às sequências de outros genes *cry1I*, visando obter as sequências completas das extremidades dos genes pela metodologia *primer walking*. Neste estudo, obteve-se a clonagem do gene *cry1Ia* completo de *B. thuringiensis* BR145 e a sequência completa desse gene, bem como a sequência de aminoácidos da proteína Cry1Ia de *B. thuringiensis* BR145 composta por 719 aminoácidos e com massa equivalente a 81 kDa.

4.2 INTRODUÇÃO

Os insetos são essenciais para a manutenção de diversos tipos de ecossistemas, atuando na reciclagem de nutrientes, na polinização e propagação de sementes, além de serem utilizados como alimentos por animais. Mesmo com características favoráveis, representam uma preocupação evidente, pois estima-se que 10% das espécies podem causar danos ao ser humano, apresentando relação direta com as questões de saúde pública, pois são grandes causadores de doenças tais como malária, dengue, febre amarela, doença de Chagas e provocam danos econômicos às lavouras. Devido às condições climáticas favoráveis para a proliferação de insetos e a grande diversidade destas espécies, os países tropicais e subtropicais estão entre os mais suscetíveis a estas doenças. A ocorrência de grandes variações no clima ocasiona novas áreas propícias para a proliferação de insetos, e requer atenção especial (Herrera-Estrela, 1999; Abdel-Hameed, 2001; Taluil, 2002).

Atualmente o controle da população de insetos é realizado, em sua maioria, por inseticidas sintéticos, cujo uso indiscriminado causa danos ambientais e para a saúde. A alta toxicidade dos defensivos sintéticos, a baixa especificidade e o alto efeito cumulativo contribuem para populações de insetos resistentes e prejuízos ao meio ambiente, tornando-se inviável a utilização de tais produtos (Arantes et al., 2002).

A resistência dos insetos aos pesticidas, a toxicidade dos inseticidas, aliados às constantes preocupações com o ambiente são fatores que promovem a busca de agentes biológicos como alternativa para o controle de insetos-praga. O uso de

bactérias entomopatogênicas como o *Bacillus thuringiensis* em controle biológico tem se mostrado viável devido seu poder inseticida (Beltrão, 2006).

B. thuringiensis é uma bactéria Gram-positiva caracterizada pela produção de cristais paraesporais, chamadas proteínas Cry, durante a fase de esporulação. Este bacilo apresenta atividade entomopatogênica específica para insetos de diversas Ordens como Lepidoptera, Diptera, Coleoptera, Homoptera e Mallophaga bem como alguns protozoários e ácaros (Glare & O'Callaghan, 2000; Vilas-Bôas et al., 2004; Berón et al., 2005). Este micro-organismo responde por 90% a 97% dos bioinseticidas usados no controle biológico no mundo (Brar et al., 2006) e, mais recentemente, vem sendo utilizado como fonte de genes para construção de plantas transgênicas que expressam proteínas entomopatogênicas, que tem estimulado a prospecção de novos genes *cry* para o desenvolvimento de novos bioinseticidas.

Estes genes, codificantes para as proteínas Cry, são classificados de acordo com a sequência de seus aminoácidos e estão divididos em 72 diferentes classes (de *cry1* até *cry72*), as quais são também divididas em subclasses (Crickmore et al., 2013). Um desses genes, atualmente denominado *cry11a* foi descrito e clonado primeiramente por Tailor et al. (1992) e denominado *cryV*. Atualmente, já foram descritos cerca de 50 genes *cry11* agrupados em 7 subclasses (*cry11a* até *cry11g*, incluindo o *cry11-like*) (Crickmore et al., 2013).

Os genes *cry11* codificam para a formação de proteínas Cry de 81 kDa (Tailor et al., 1992; Tounsi et al., 2003), que são secretadas no início da fase estacionária e que não se acumulam em cristais como as demais proteínas Cry (Escudero et al., 2006; Tounsi et al., 2003), o que torna difícil conhecer a atividade entomopatogênica dessas proteínas, sendo necessário a clonagem e a expressão desses genes em *Escherichia coli* ou em linhagens acristalíferas de *B. thuringiensis*. Segundo Tailor et

al. (1992), o gene *cry1Ia* apresenta atividade inseticida contra as Ordens Lepidoptera e Coleoptera. No entanto, posteriormente, trabalhos com outros *cry1I* relataram a ação deste gene apenas para lepidópteros (Choi et al., 2000; Song et al., 2003; Tounsi et al., 2003; Escudero et al., 2006).

No Brasil, as condições climáticas são favoráveis ao aparecimento de diversos insetos. Algumas espécies são consideradas pragas de importância econômica, como *Spodoptera frugiperda* (Grossi-de-Sá et al., 2007; Santos et al., 2009), *Anticarsia gemmatalis* (Monnerat et al., 2007), *Anthonomus grandis* (Grossi-de-Sá et al., 2007) por causarem danos significativos em importantes culturas agrícolas, como milho, algodão e soja, respectivamente. Essas espécies são sensíveis à ação dos cristais proteicos de *B. thuringiensis*, no entanto, outras espécies são pouco sensíveis, como os coleópteros *Phaedon brassica*, *Agelastica coerulea*, *Diabrotica speciosa* e *Tenebrio molitor* (Grossi-de-Sá et al., 2007). Dessa forma, considerando-se o fato de que as proteínas Cry1I não são componentes de cristais proteicos, mas são patogênicas a diversas espécies, essas podem constituir novos componentes para o controle biológico dessas espécies.

Assim, esse trabalho visa à obtenção da sequência nucleotídica completa de um gene *cry1I* de um isolado brasileiro de *B. thuringiensis*, bem como sua caracterização.

4.3 MATERIAL E MÉTODOS

4.3.1 Linhagem de *B. thuringiensis* e *Escherichia coli*

A linhagem BR145 de *B. thuringiensis* portadora de genes *cry1* isolada de solo brasileiro e pertencentes ao Banco de Bactérias do Laboratório de Genética e

Taxonomia de Micro-organismos da Universidade Estadual de Londrina foi utilizada para a busca de genes *cry1I*.

A linhagem de *E. coli* DH10B (Life Technologies, USA) foi utilizada para as transformações durante as etapas de clonagem.

4.3.2 Extração de DNA genômico e plasmidial

Amostras de DNA genômico dos isolados de *B. thuringiensis* foram extraídas pelo método de Hansen & Hendriksen (2001). Os isolados foram cultivados por 15 h/ 30°C em placas contendo meio Luria-Bertani (LB: triptona 1,0%, extrato de levedura 0,5% e NaCl 1,0%). Com o auxílio de um palito esterilizado, uma colônia de aproximadamente 2 mm de diâmetro foi transferida para microtubos contendo 200 µL de TE (10 mM de Tris; 1 mM de EDTA; pH 8,0). A suspensão foi homogeneizada e incubada em banho-Maria sob fervura por 10 min. Em seguida a suspensão foi centrifugada a 12.000 x *g* por 3 minutos e o sobrenadante transferido para novos tubos e utilizado como amostra de DNA para as reações de amplificação por PCR .

O DNA plasmidial dos clones transformados de *E. coli* foi extraído por lise alcalina conforme descrito por Sambrook et al. (2001). Os clones foram inoculados em 5 mL de meio LB suplementado com ampicilina (50 µg/mL). Os inóculos foram incubados a 37°C overnight sob agitação a 180 rpm. A cultura foi distribuída em microtubos para microcentrifuga (1,5 mL) e centrifugados a 12000 rpm por 5 min (2x) e o sobrenadante foi descartado. Os “pellets” foram ressuspensos em 100 µL de GET (Glicose 50mM, Tris-HCl pH 8,0 25 mM; EDTA 10 mM) com 2,5 µL de RNase (20 ng/mL). Foram adicionados 100 µL de solução de lise (NaOH 10N, SDS 10%) levementes homogeneizados e incubados por exatamente 5 min em banho de gelo. Decorrido o tempo, foram adicionados 200 µL de solução de neutralização

KOAc 3M gelada, seguindo-se suaves agitações por inversão. Após a neutralização, foram centrifugados a 12000 rpm por 10 min. Os sobrenadantes foram coletados e transferidos para novos tubos onde foram adicionados 2 volumes e meio de etanol absoluto gelado e incubados por 15 min à -20°C. Após, foram centrifugados a 12000 rpm por 10 min e os sobrenadantes descartados. Foram adicionados 500 µL de etanol 70% lavando as paredes do tubo e descartando o sobrenadante. Os tubos secaram em fluxo laminar por 20 min. As amostras de DNA plasmidial foram ressuspensas em 20 µL de água Milli-Q e mantidas a -20°C.

Após a extração do DNA plasmidial dos clones, a verificação da presença de plasmídeos e a determinação da quantidade de DNA, foram feitas pela aplicação do material obtido em gel de agarose 0,8 e posteriormente utilizados nas reações de sequenciamento.

4.3.3 Amplificação e clonagem do gene *cry1la*

A presença dos genes *cry* foi analisada por meio da técnica de PCR utilizando, inicialmente, *iniciadores degenerados* descritos por Berón et al. (2005). Após, os produtos de PCR obtidos nessa reação, foram visualizados em gel de agarose a 0,8%, foram diluídos na proporção de 1:50 e utilizados como molde para as amplificações posteriores com os iniciadores OL2 e OL4.

Posteriormente, para as demais amplificações, foram desenvolvidos novos iniciadores usando como base a técnica de *primer walking* (Matsukuma, 2000). Os novos oligonucleotídeos foram previamente analisados pelo programa Gene Runner v.3.01 (Hastings Softwares Inc., 1994). Nessa etapa, as reações de amplificação foram conduzidas com um volume total de reação de 25 µL, contendo 1 U de *Taq* Dna polimerase (Invitrogen), 2,5 µL de tampão 10X (200 mM Tris-HCl pH 8,0, 500 mM de KCl), 2,5 mM de MgCl₂, 0,25 mM de dNTP, 0,5 µM de cada

iniciador, 2,0 µL do DNA extraído e água Milli-Q. Os ciclos de amplificação foram compostos por uma etapa de desnaturação de 95°C por 2 min, seguida de 30 ciclos (desnaturação a 95°C por 1 min, pareamento conforme Tabela 1, extensão a 72°C por 1 min) seguidos de uma etapa final extensão a 72°C por 5 min (Tabela 1). Em todas as reações de amplificação foi utilizado o termociclador Endurance TC-412 Techne.

Os produtos de PCR foram verificados por eletroforese em gel de agarose a 1,2% em tampão TBE (89 mM Tris Borato, 2 mM EDTA, pH 8,0) corados com Syber Safe (Invitrogen) usando marcador de 1Kb DNA plus *ladder* (Life Technologies).

Tabela 2 – Oligonucleotídeos utilizados para obtenção da sequência completa do gene *cry1la* de isolados brasileiros de *B. thuringiensis*, destacando-se a posição de pareamento no gene e a temperatura utilizada nas reações de amplificação .

Iniciadores	Posição	Sequência	Tm °C
OL1 (d) ^a	510	5' TAHCANYATAYGCACARGCHCGMAAYTTHCAT	40
OL5 (r) ^a	1788	5' GGAATAAATTCRATTYTRTCTATATAAA	40
OL2 (d) ^a	892	5' AGAGAHRTGAHWDTDAHRGTATTRGAT	40
OL4 (r) ^a	1698	5' AGCATADCGRAHNCYHRYDYVATA	40
<i>cry1la</i> F ^b	1 - 24	5' ATGAAACTAAAGAATCA/CAGATAAG	55
<i>cry1la</i> Rint ^b	444 - 464	5' CTAGCCCTTGTGTTATTACGA	57
<i>cry1lgralR</i> ^b	893 - 911	5' GTACTGTCCCAATTGCGTC	55

cry1I F ^b	1316 - 1336	5' CTATTATCCAGGGTATGCTG	56
cry1Ia Fint ^b	1809 - 827	5' GAGGACTTAGACTATAAAACC	55
cry1I R ^b	4734 - 752	5' CGCGTATTTAACTATCTCG	53
cry1Ia Rend ^b	2165 - 186	5' CTACATGTTACGCTCAATATG	55

^a Primers degenerados descritos por Berón et al., 2005.

^b Oligonucleotídeos desenvolvidos por Ricietto, 2012

Os fragmentos obtidos foram purificados utilizando-se Cycle Pure Kit (Omega Bio-Tek), quantificados por ScanDrop (Analytik Jena) e clonados no vetor pGEM-T Easy (PROMEGA). A ligação foi utilizada para a transformação de células de *E. coli* DH10B (Life Technologies) competentes.

4.3.4 Células competentes e transformação de *E. coli* DH10B

As células competentes utilizadas para a transformação foram obtidas conforme descrito por Hanahan (1983), com modificações como se segue :

A partir de um pré-inóculo de 10 mL em meio LB incubado overnight à 37°C sob agitação (180 rpm), foi inoculado um frasco contendo 100 mL de meio LB suplementado (2x com triptona 1% e extrato de levedura 0,5%) o qual foi incubado a 37°C sob agitação até obtenção de D.O_{600nm} entre 4,0 e 6,0. Decorrido este tempo, a cultura foi submetida a banho de gelo por 5 min, após centrifugado a 5000 rpm por 5 min e o sobrenadante foi desprezado. Em seguida, as células foram ressuspensas em 500 µL de CaCl₂ 50mM e incubadas em gelo por 10 min. Após foram centrifugadas a 5000 rpm por 5 min e descartado o sobrenadante. As células foram novamente ressuspensas em 300 µL de CaCl₂ 50mM e incubadas em banho de

gelo por 20 min. A suspensão de células foi distribuída em alíquotas nos tubos de microcentrifuga previamente resfriados e estocadas a -20°C .

Células de *E. coli* foram transformadas através do método de *heat-shock*, descrito por Sambrook e colaboradores (2001).

Ao volume de 50 μL de células competentes foi adicionado 3 μL do produto de ligação, seguindo-se incubação em banho de gelo por 20 min. Após este tempo, a suspensão de células foi submetida a tratamento de choque térmico pela transferência do tubo para um banho-maria a 42°C por 2 min transferindo imediatamente para o gelo. Em seguida, foram adicionados a cada tubo 1000 μL de meio LB seguindo-se incubação sob agitação a 110 rpm por 1 h a 37°C . Decorrido esse tempo, os tubos foram centrifugados a 5000 rpm por 10 min e o pellet foi ressuspendido em 100 μL de meio LB. As células foram semeadas em meio LB ágar com 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina e 60 μL de X-Gal (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para a seleção por α -complementação. As placas foram incubadas em estufa a 37°C *overnight*. Os clones transformantes que desenvolveram a coloração branca foram selecionados e transferidos para placas de Petri contendo LB suplementado com ampicilina para crescimento e posterior estocagem em glicerol (50%) e manutenção a -80°C .

4.3.5 Sequenciamento de DNA e análise computacional das sequências

O sequenciamento foi feito com produto de PCR purificado e quantificado anteriormente através de comparação com diferentes concentrações de fago lambda. Foi utilizado o kit de sequenciamento “BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kits” (Applied Biosystems). Para as reações de sequenciamento foi preparado um volume de 10 μL contendo 2,0 μL de “BigDye”, 1 μL de Tampão 5X (1M Tris-HCl pH 9,0, 50 mM de MgCl_2 e água Mili-Q q.s.p 10mL), 0,5 μM de iniciador, 1 μL de DNA e água Mili-Q. O ciclo utilizado foi desnaturação a 95°C por

3 min, seguida de 35 ciclos (95°C por 15 s, 55°C por 15 s, 60°C por 2 min) e extensão final à 60°C por 1 min). Os produtos foram precipitados (EDTA 125 mM e etanol 100%) e sequenciados no sequenciador automático ABI PRISM™ 3500XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

As sequências obtidas foram comparadas às sequências depositadas no banco de dados do GeneBank por BLASTn pelo endereço eletrônico (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e alinhadas através do programa MEGA v. 5.10 (Tamura, 2011) para a determinação da sequência completa dos genes. A qualidade das sequências foi confirmada pela análise dos cromatogramas no programa Sequencher v.5.0 (Gene Codes Inc., Ann Arbor, MI, USA) e a sequência consenso obtida pelo programa BioEdit v.7.1.11 (Hall, 1999).

Para a construção do dendrograma de similaridade genética, as sequências foram alinhadas e agrupadas por UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Means*), com análises de bootstrap com 1000 repetições pelo programa MEGA v. 5.10.

Para as análises da sequência de aminoácidos quanto aos domínios necessários para a atividade da toxina Cry1Ia de *B. thuringiensis* BR145 foi utilizado a ferramenta de busca para domínios conservados no endereço eletrônico (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) e comparada as demais sequências depositadas por BLASTx pelo endereço eletrônico (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados mostraram a presença de fragmentos com tamanhos de 900 pb (Figura 1) que, segundo os autores, poderiam ser provenientes da amplificação de genes *cry* das classes *cry1*, *cry3*, *cry8* e *cry9* (Béron et al., 2005).



Figura 1 - Amplificação de genes *cry* por iniciadores degenerados OL2 e OL4 descritos por Berón et al. (2005). Marcador de peso molecular 1 Kb (Invitrogen).

Após o sequenciamento dos fragmentos de 900 pb, amplificados com os iniciadores OL2 e OL4, as sequências obtidas foram alinhadas com sequências depositadas no banco de dados NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). A sequências de *B. thuringiensis* BR145 apresentou 88% de cobertura e 97% de identidade com a sequência do gene *cry1Ia* (número de acesso X62821.1) descrita por Tailor et al. (1992).

Dessa forma, a sequência completa do gene *cry1Ia* (X62821.1) foi utilizada como base para a obtenção de novos iniciadores a serem utilizados de acordo com a técnica de *primer walking*, visando a obtenção da sequência completa desse gene (Figura 2).

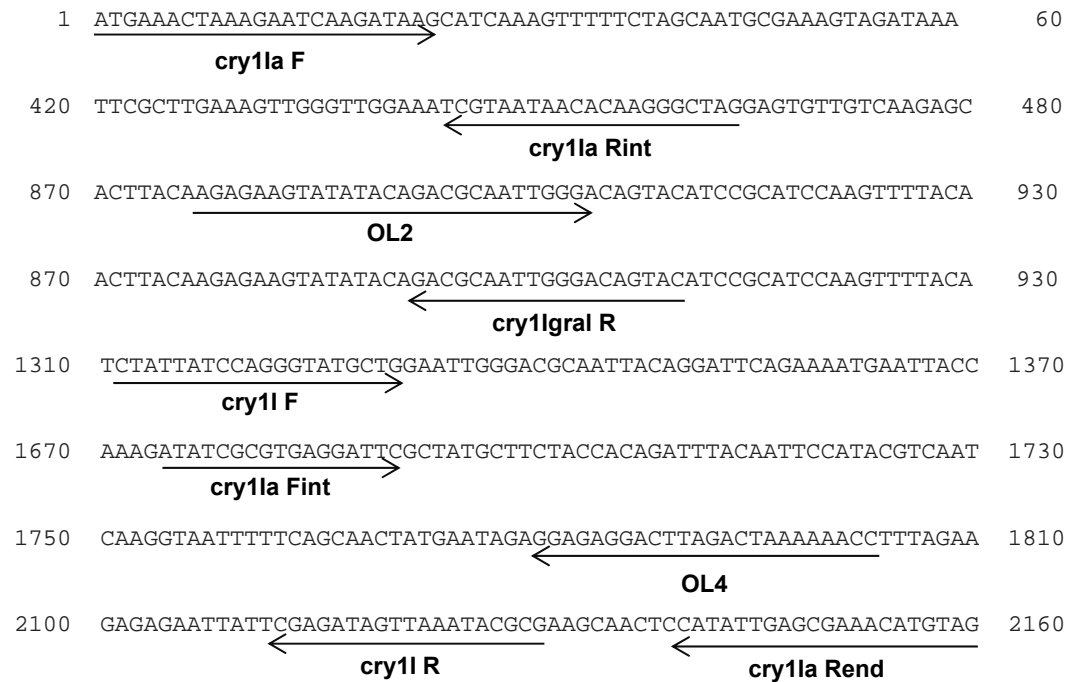


Figura 2 – Representação da localização dos oligonucleotídeos na sequência do gene *cry1la* (X62821.1).

A amplificação com os novos oligonucleotídeos confirmou a presença do gene *cry1la* na linhagem testada (Figura 3).



Figura 3. Amplificação do fragmento inicial do gene *cry1la*. Reação de amplificação por PCR utilizando os pares de iniciadores *cry1la* e *cry1lgralR* com tamanho esperado de 900 pb.

A clonagem do gene *cry1Ia* foi obtida para *B. thuringiensis* BR145, inicialmente, através de fragmentos amplificados que localizam-se nas extremidades e região central do gene (Figura 4). Posteriormente, clones de *B. thuringiensis* BR145 contendo o gene *cry1Ia* completo foram obtidos.

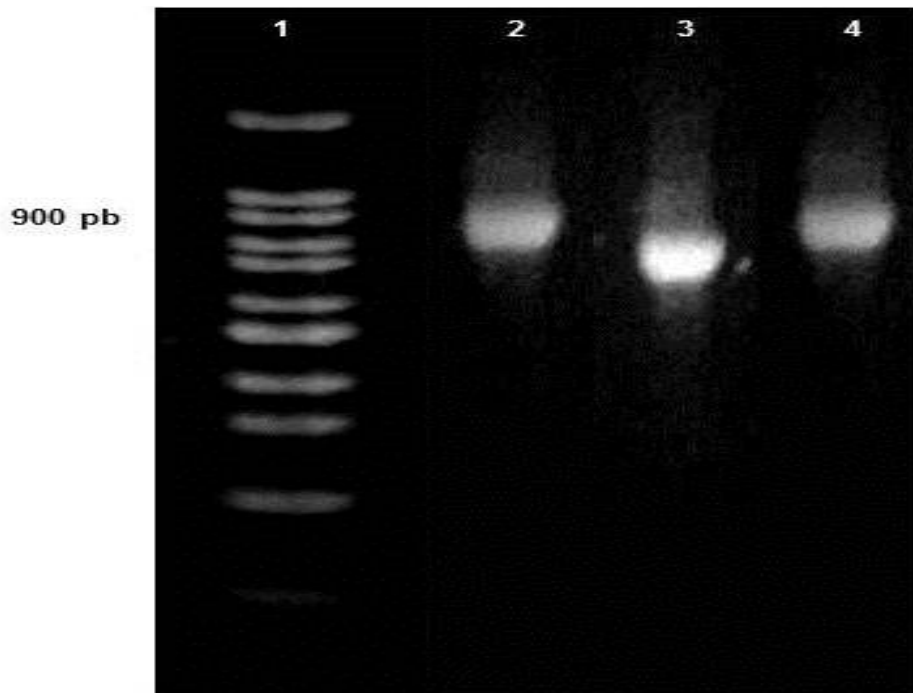


Figura 4. Confirmação do produto clonado através de PCR de colônia com amplificação dos três fragmentos do gene *cry1IA* para *B. thuringiensis* BR145. 1 – Marcador 100 pb Ladder (Invitrogen), 2 – fragmento inicial do gene amplificado com *cry1Ia* e *cry1IgralR*, 3 – fragmento central amplificado com OL2 e OL4¹, 4 – fragmento final do gene amplificado com *cry1IF* e *cry1IREND*.

O alinhamento de todas as sequências permitiu a obtenção da sequência completa do gene *cry1Ia* apenas para *B. thuringiensis* BR145 (Figura 5).

1 ATGAACTAAAGAATCAAGATAAGCATCAAAGTTTTTCTAGCAATGCGAAAGTAGATAAA 60
M K L K N Q D K H Q S F S S N A K V D K
 61 ATCTCTACGGATTCACATAAAAAATGAAACAGATATAGAATTACAAAACATTAATCATGAA 120
I S T D S L K N E T D I E L Q N I N H E
 121 GATTGTTTGAAAATGTCTGAGTATGAAAATGTAGAGCCGTTTGTAGTCATCAACAATT 180
D C L K M S E Y E N V E P F V S A S T I
 181 CAAACAGGTATTGGTATTGCGGGTAAAATACTTGGTACCCTAGGCGTTTCTTTTGCAGGA 240
Q T G I G I A G K I L G T L G V P F A G
 241 CAAGTAGCTAGTCTTTATAGTTTATCTTAGGTGAGCTATGGCCTAAGGGGAAAAATCAA 300
Q V A S L Y S F I L G E L W P K G K N Q
 301 TGGGAAATCTTTATGGAACATGTAGAAGAGATTATTAATCAAAAAATATCAACTTATGCA 360
W E I F M E H V E E I I N Q K I S T Y A
 361 AGAAATAAAGCACTTACAGACTTGAAAGGATTAGGAGATGCCTTAGACTGTCTACCATGAT 420
R N K A L T D L K G L G D A L A V Y H D
 421 TCGCTTGAAAGTTGGGTTGAAAATCGTAATAACACAAGGGCTAGGAGTGTGTCAAGAGC 480
S L E S W V G N R N N T R A R S V V K S
 481 CAATATATCGCATTAGAATTGATGTTTCGTTTCAGAAACTACCTTCTTTTGCAGTGTCTGGA 540
Q Y I A L E L M F V Q K L P S F A V S G
 541 GAGGAGGTACCATTATTACCGATATATGCCCAAGCTGCAAATTTACATTTGTTGCTATTA 600
E E V P L L P I Y A Q A A N L H L L L L
 601 AGAGATGCATCTATTTTTGAAAAGAGTGGGGATTATCATCTTCAGAAATTTCAACATTT 660
R D A S I F G K E W G L S S S E I S T F
 661 TATAACCGTCAAGTCGAACGAGCAGGAGATTATCCGACCATTGTGTGAAATGGTATAGC 720
Y N R Q V E R A G D Y S D H C V K W Y S
 721 ACAGGTCTAAATAAAGTTGAGGGGTACAAATGCCGAAAGTTGGGTACGATATAATCAATTC 780
T G L N N L R G T N A E S W V R Y N Q F
 781 CGTAGAGACATGACTTTAATGGTACTAGATTTAGTGGCACTATTTCCAAGCTATGATACA 840
R R D M T L M V L D L V A L F P S Y D T
 841 CAAATGTATCCAATTAAGACTACAGCCCAACTTACAAGAGAAGTATATACAGACGCAATT 900
Q M Y P I K T T A Q L T R E V Y T D A I
 901 GGGACAGTACATCCGCATCCAAGTTTACAAGTACGACTTGGTATAATAATAATGCACCT 960
G T V H P H P S F T S T T W Y N N N A P
 961 TCGTTCCTGCCATAGAGGCTGCTGTTGTTTCGAAACCCGCATCTACTCGATTTTCTAGAA 1020
S F S A I E A A V V R N P H L L D F L E
 1021 CAAGTTACAATTTACAGCTTATTAAGTCGATGGAGTAACACTCAGTATATGAATATGTGG 1080
Q V T I Y S L L S R W S N T Q Y M N M W
 1081 GGAGGACATAAACTAGAATTCGGAACAATAGGAGGAACGTTAAATATCTCAACACAAGGA 1140
G G H K L E F R T I G G T L N I S T Q G
 1141 TCTACTAATACTTCTATTAATCCTGTAACATTACCGTTCACTTCTCGAGACGCTATAGG 1200
S T N T S I N P V T L P F T S R D V Y R
 1201 ACTGAATCATTGGCAGGGCTGAATCTATTTTAACTCAACCTGTTAATGGAGTACCTAGG 1260
T E S L A G L N L F L T Q P V N G V P R

```

1261 GTTGATTTTCATTGGAAATTCGTCACACATCCGATCGCATCTGATAATTTCTATTATCCA 1320
      V D F H W K F V T H P I A S D N F Y Y P
1321 GGGTATGCTGGAATTGGGACGCAATTACAGGATTCAGAAAATGAATTACCACCTGAAGCA 1380
      G Y A G I G T Q L Q D S E N E L P P E A
1381 ACAGGACAGCCAAATTATGAATCTTATAGTCATAGATTATCTCATATAGGACTCATTTCA 1440
      T G Q P N Y E S Y S H R L S H I G L I S
1441 GCATCACATGTGAAAGCATTGGTATATTCTTGGACGCATCGTAGTGCAGATCGTACAAAT 1500
      A S H V K A L V Y S W T H R S A D R T N
1501 ACAATTGAGCCAAATAGCATTACACAAATACCATTAGTAAAAGCTTTCAATCTGTCTTCA 1560
      T I E P N S I T Q I P L V K A F N L S S
1561 GGTGCCGCTGTAGTGAGAGGACCAGGATCTACAGGTGGGATATCCTTCAAGAACGAAT 1620
      G A A V V R G P G S* T G G D I L R R T N
1621 ACTGGTACATTTGGGGATATACGAGTAAATATTAATCCACCATTTGCACAAAGATATCGC 1680
      T G T F G D I R V N I N P P F A Q R Y R
1681 GTGAGGATTCGCTATGCTTCTACCACAGATTTACAATCCATACGTCAATTAACGGTAAA 1740
      V R I R Y A S T T D L Q F H T S I N G K
1741 GCTATTAATCAAGGTAATTTTTCAGCAACTATGAATAGAGGAGAGACTTAGACTAAAAA 1800
      A I N Q G N F S A T M N R G E D L D * K
1801 ACCTTTAGAAGTGTAGGCTTTACCACTCCATTTAGCTTTTGTAGATGTACAAAAGTACATTC 1860
      T F R T V G F T T P F S F L D V Q S T F
1861 ACAATAGGTGCTTGGAACTTCTCTTCAGGTAACGAAGTTTATATAGATAGAATTGAATTT 1920
      T I G A W N F S S G N E V Y I D R I E F
1921 GTTCCGGTAGAAGTAACATATGAGGCAGAATATGATTTTGAAAAAGCGCAAGAGAAGGTT 1980
      V P V E V T Y E A E Y D F E K A Q E K V
1981 ACTGCACTGTTTACATCTACGAATCCAAGAGGATTAACAAACAGATGTAAAGGATTATCAT 2040
      T A L F T S T N P R G L K T D V K D Y H
2041 ATTGACCAGGTATCAAATTTAGTAGAGTCTCTATCAGATGAATTCTATCTTGATGAAAAG 2100
      I D Q V S N L V E S L S D E F Y L D E K
2101 AGAGAATTATTCGAGATAGTTAAATACGCGAAGCAACTCCATATTGAGCGAAACATGTAG 2160
      R E L F E I V K Y A K Q L H I E R N M*

```

Figura 5 – Sequência completa de DNA do gene *cry1Ia* da linhagem *B. thuringiensis* BR145 com a sequência deduzida de aminoácidos. O peptídeo sinal (*italico*) para secreção está presente no início da sequência. As regiões em destaque (cinza) demarcam os domínios I, II e III, respectivamente, desta proteína. Os aminoácidos onde ocorreram as mutações em relação ao gene *cry1Ia14* (ACG63871) estão assinalados com asteriscos.

A sequência completa do gene *cry1I* de *B. thuringiensis* BR145 apresenta um total de 2160 pb. O alinhamento completo dessa sequência com as de outros genes

cry1I apresentou uma cobertura de 100% e identidade de 97 a 99% em relação aos demais genes *cry1Ia* depositados no banco de sequências de genes *cry* (Crickmore et al., 2013), o que permitiu a identificação do gene de *B. thuringiensis* BR145 como pertencendo a classe de genes *cry1Ia*.

A partir da sequência completa do gene *cry1Ia* de *B. thuringiensis* BR145, foi deduzida a sequência de aminoácidos, a qual é composta por um total de 719 aminoácidos (Figura 5), equivalente a uma proteína com massa molecular de 81kDa. Na extremidade N-terminal, pode-se identificar uma sequência líder composta por 45 aminoácidos, determinante para que esta proteína seja secretada (Kostichka et al., 1996). Essa sequência líder é seguida de três domínios proteicos (Figura 5), conforme descrito anteriormente para outras proteínas Cry1Ia (Tailor et al., 1992; Gleave et al., 1993; Kostichka et al., 1996; Tounsi et al., 2003; Escudero et al., 2006).

O alinhamento global da sequência completa do gene *cry1Ia* de *B. thuringiensis* BR145 com sequências de outros genes *cry1Ia* depositadas no NCBI revelou algumas mutações pontuais (Tabela 1 - Anexos) como na sequência de nucleotídeos depositada por Tailor et al. (1992). Na posição 697, ocorreu uma transversão T para G resultando com a troca do aminoácido de tirosina para aspartato no domínio I; na posição 1589 houve uma transição de T para C que resultou na troca de fenilalanina para serina no domínio II, e em III nas posições 1797 e 2151 ocorreram transversões de T para A, entretanto não ocorreram troca de aminoácidos nestas posições.

Considerando que atualmente são descritos 30 tipos de genes *cry1Ia* (Crickmore et al., 2013), para a identificação do tipo de gene *cry1Ia* presente em *B. thuringiensis* BR145na linhagem BR145, foi feito um alinhamento múltiplo das

sequências nucleotídicas, pelo uso do programa MEGA 5.10, o que permitiu a construção de um dendrograma com a formação dos grupos A e B. O grupo A agrupou a sequência do gene de *B. thuringiensis* BR145 e dos genes *cry1la* (com exceção do *cry1la18*). A identidade observada entre a sequência nucleotídica de *B. thuringiensis* BR145 com as demais sequências foi de 99%, com exceção do gene *cry1la7* descrito por Porcar et al. (2006) que obteve identidade de 97%. Esta diferença na identidade pode ser explicada pelo número de mutações presentes nesta sequência em relação às demais sequências do grupo *cry1la* (Tabela 1 - Anexos).

A comparação da sequência de *B. thuringiensis* BR145 com as sequências agrupadas no grupo B, o qual foi composto pelos genes *cry1la18* (Li et al., 2010), *cry1lb1* (Shin et al., 1995), *cry1lb2* (Guan et al., 2007), *cry1lb3* (Liu & Guo et al., 2008), *cry1lb4* (Zhao et al., 2010), *cry1lb6* (Li et al., 2010), *cry1lc1* (Osman et al., 1998), resultou em 93% e 92% de identidade.

A sequência *cry1d1* descrita por Choi et al. (2000) foi utilizada como raiz para a construção do dendrograma e apresentou 91% de identidade com a sequência de *B. thuringiensis* BR145 (Figura 6).

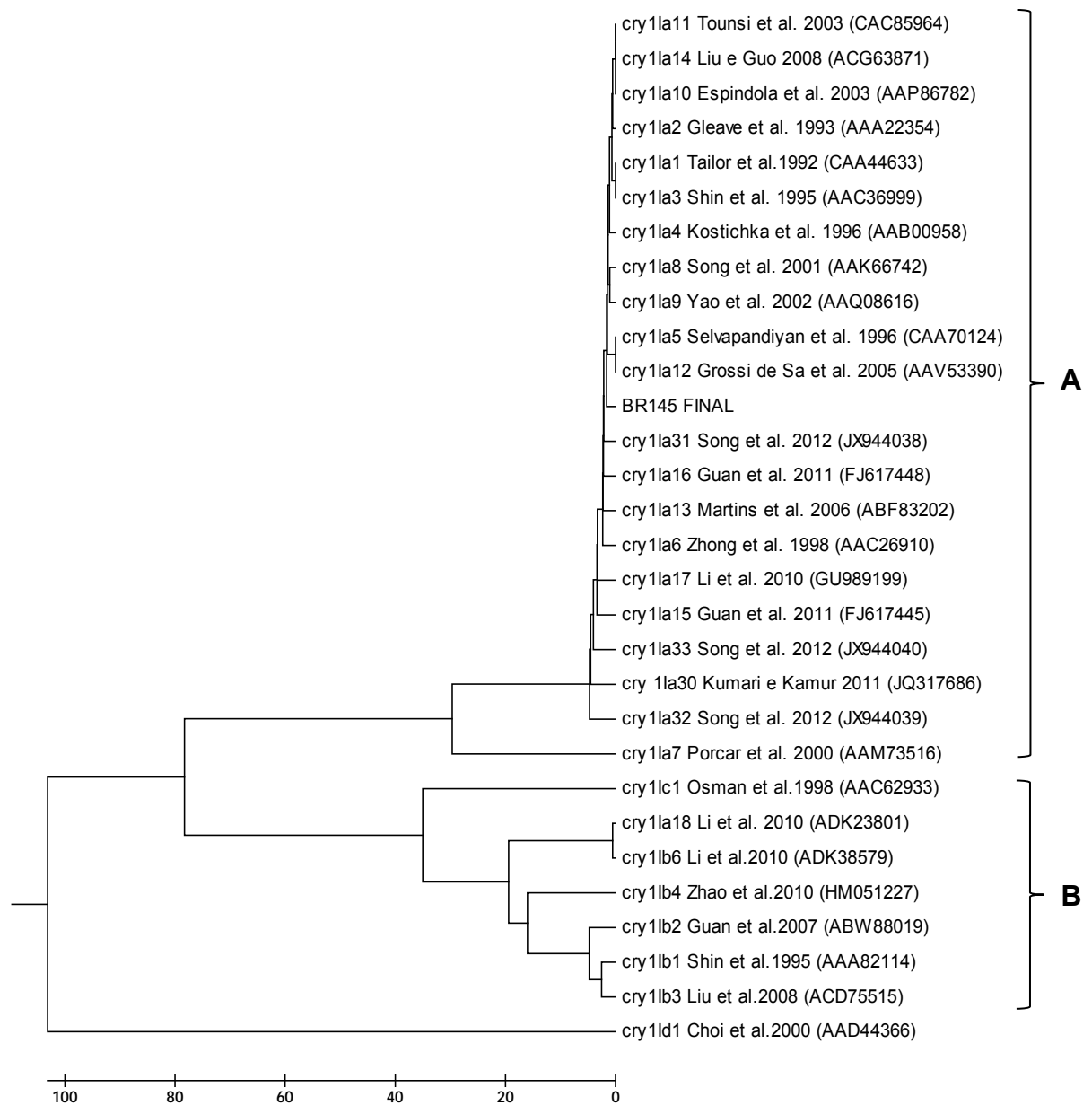


Figura 6 – Dendrograma de similaridade genética do alinhamento entre a sequência do gene *cry1la* de *B. thuringiensis* BR145 com demais sequências do gene *cry1l* mostrando a similaridade entre elas.

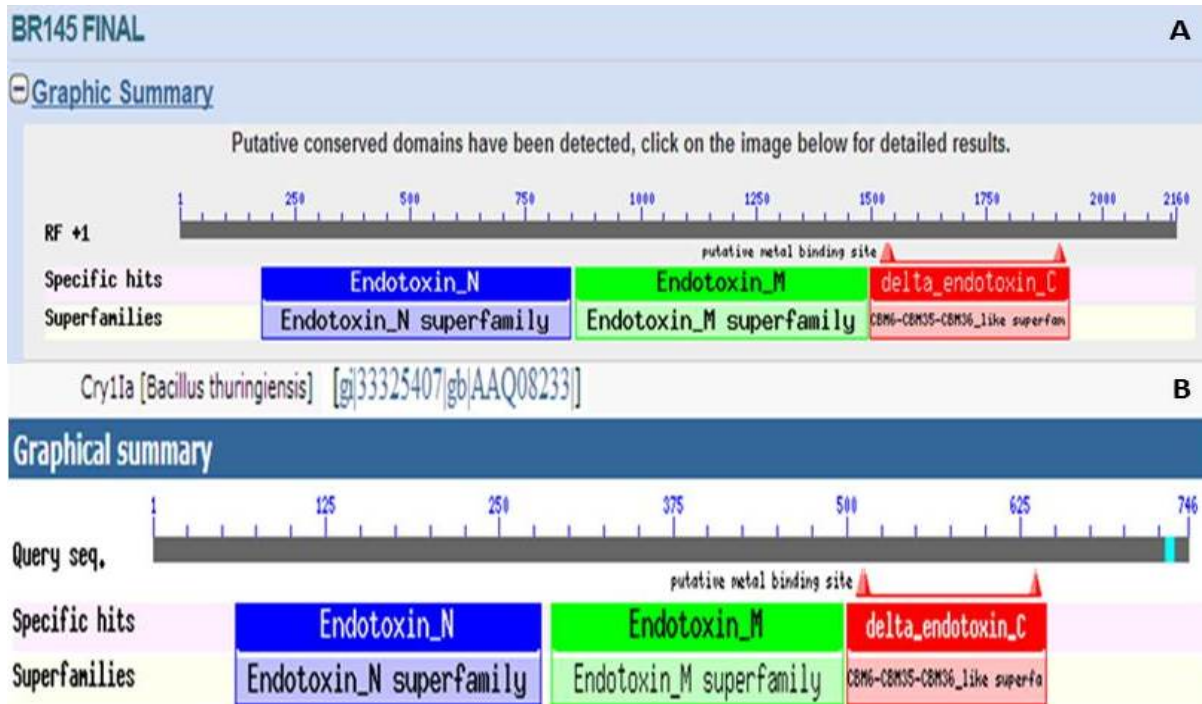


Figura 7 – Representação dos três domínios funcionais das toxinas Cry1Ia1 e Cry1Ia9 (**A** – proteína Cry1Ia de *B. thuringiensis* BR145 e **B** - Cry1Ia9 acesso: AAQ082331).

A análise da sequência de aminoácidos do gene *cry1Ia* de *B. thuringiensis* BR145 mostrou que essa proteína possui os três domínios (Figura 7) necessários para a atividade entomopatogênica da toxina.

Sendo assim, conclui-se que as alterações encontradas na sequência de aminoácidos da toxina Cry1Ia de *B. thuringiensis* BR145 em relação às sequências de aminoácidos de outras toxinas Cry1Ia permite a proposição deste gene como sendo um novo gene *cry1Ia*, considerando que a classificação proposta por Crickmore e colaboradores (1998) apresenta como critério a similaridade de aminoácidos entre as proteínas Cry.

5. REFERÊNCIAS

ABDEL-HAMEED, A. A stirred tank culture of *Bacillus thuringiensis* H-14 for production of the mosquitocidal δ -endotoxin: mathematical modelling and scaling-up studies. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 17 (9): 857-861, 2001.

ARANTES, O. M. N.; VILAS-BÔAS, L. A.; VILAS-BÔAS, G. F. L. T. *Bacillus thuringiensis*: estratégias no controle biológico. In: SERAFINE, L.A; BARROS, N. M; AZEVEDO, J. L. (Org.). **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. Caxias do Sul: Agropecuária, 2002. p. 269 – 293.

BELTRÃO, H. de B. M. **Interação das toxinas Cry do *Bacillus thuringiensis* ssp. israelensis com o mesêntero de larvas do vetor *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)**. 2006. 96 f. Dissertação (Mestrado) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – FIOCRUZ, Recife. 2006

BERÓN, C.M., CURATTI, L., and SALERNO, G. New strategy for identification of novel cry-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains. **Applied Environmental Microbiology**, 71 (2): 761 – 765, 2005.

BISHOP, A. H.; BONE, E. J.; ELLAR, D. J. 1994. Cloning of novel *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein?cmd=Retrieve&db=protein&dopt=GenPept&list_uids=565394> Acesso em: fev. 2013.

BRAR, S. K.; VERMA, M.; TYAGI, R. D.; VALÉRO J. R. Recent advances in downstream processing and formulations of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. **Process Biochemistry**, 41 (2): 323 – 342, 2006.

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

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D. R.; FEITELSON, J.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; DEAN, D. H. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 62: 807 – 813, 1998.

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D. R.; SCHENPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; BRAVO, A.; DEAN, D. H. ***Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature**. Disponível em <http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/>. Acesso em: 08 fev 2013.

ESCUADERO, I.R.; ESTELA, A.; PORCAR, M.; MARTÍNEZ, C.; OGUIZA, J.A.; ESCRICHE, B.; FERRÉ, J.; CABALLERO, P. Molecular and Insecticidal Characterization of a Cry1I Protein Toxic to Insects of the Families Noctuidae, Tortricidae, Plutellidae and Chrysomelidae. **Applied Environmental Microbiology**, 4796-4804, 2006.

GLARE, T.R.; O'CALLAGHAN, M. **Bacillus thuringiensis: Biology, Ecology and Safety**. Wiley & Sons, 2000.

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

GROSSI-de-SA, M.F.; MAGALHÃES, M.Q.; SILVA, M.S.; SILVA, S.M.B.; DIAS, S.C.; NAKASU, E.Y.T.; BRUNETTA, P.S.F.; OLIVEIRA, G.R.; NETO, O.B.O. OLIVEIRA, R.S.; SOARES, L.H.B.; AYUB, M.A.Z.; SIQUEIRA, H.A.A.; FIGUEIRA, E.L.Z. Susceptibility of *Anthonomus grandis* (Cotton Boll Weevil) and *Spodoptera frugiperda* (Fall Armyworm) to a Cry1Ia-type Toxin from a Brazilian *Bacillus thuringiensis* Strain. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, 40 (5): 773 – 782, 2007.

GUAN, X. 2007. Nucleotide sequence of a new *Bacillus thuringiensis cry1Ib*-type gene. Disponível em < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/159131958> >. Acesso em set. 2012.

GUAN, P.; ZHENG, A.; LI, P.; ZHU, J. 2011. Cloning a novel insecticidal *cry1Ia* gene from a *Bacillus thuringiensis* E-1B. Disponível em < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/256003036> >. Acesso em set. 2012.

HALL, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, 41, 95 – 98.

HANAHAN, D. Studies on Transformation of *Escherichia coli* with Plasmids. **Journal of Molecular Biology**, 166: 557 – 580, 1983.

HANSEN, B. M.; HENDRIKSEN, N. B. Detection of enterotoxic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis. **Applied Environmental Microbiology**, 67, 185 – 189, 2001.

HERRERA-ESTRELA, L. Transgenic plants for tropical regions: Some consideration about their development and their transfer to the small farmer. **Proceedings of the National Academic of Science**, 96, 5978 – 5981, 1999.

KOSTICHKA, K.; WARREN, G.W.; MULLINS, M.; MULLINS, A.D.; CRAIG, J.A.; KOZIEL, M.G.; ESTRUCH, J.J. Cloning of a *cryV*-type Insecticidal Protein Gene from *Bacillus thuringiensis*: the *cryV*-Encoded Protein Is Expressed Early in Stationary Phase. **Journal of Bacteriology**, 178 (7): 2141 – 2144, 1996.

KUMARI, G. K. G. and KAUR, S. 2012. Isolation and cloning of full-length *cry1I* – gene from *Bacillus thuringiensis*. Disponível em < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/374251084> >. Acesso em fev. 2013.

LI, H.; ZHANG, Q.; LI, M.; GAO, J. 2010 Expression and purification of recombinant Cry1I toxin protein in *Escherichia coli*. Disponível em < http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/toxins2.html >. Acesso em

set. 2012.

LIU, T. GUO, W. 2008. **Nucleotide sequence of a new *Bacillus thuringiensis cry11b*-type gene.** Disponível em < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/189039462>>. Acesso em set. 2012

MATSUKUMA, A. Y. **Sequenciamento e anotação de parte do genoma de *Xylella fastidiosa*.** 2000. 158 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade São Paulo – USP, São Paulo, 2000.

MONNERAT, R. G.; BATISTA, A.C.; MEDEIROS, P.T.; MARTINS, E.S.; MELATTI, V.M.; PRAÇA, L.B.; DUMAS, V.F.; MORINAGA, C.; DEMO, C.; GOMES, A.C.M.; FALCAO, R.; SIQUEIRA, C.B.; SILVA-WERNECK, J.O.; BERRY, C. Screening of Brazilian *Bacillus thuringiensis* isolates active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatilis*. **Biological Control**, 41 (3): 291 – 295, 2007.

NCBI. National Center of Biotechnology Information. 2013. Disponível em < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso: fev. 2013.

OSMAN, Y.A.; MADKOUR, M.A.; BULLA, L.A. Jr. 1998. Direct Submission. Disponível em < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?cmd=Retrieve&db=protein&dopt=GenPept&list_uids=3702807 >. Acesso em set. 2012.

PORCAR, M.; MARTINEZ, C.; CABALLERO, P. 2006. Identification and characterization of a novel *cry* gene from *Bacillus thuringiensis*. Disponível em < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?cmd=Retrieve&db=protein&dopt=GenPept&list_uids=21665941>. Acesso em set., 2012

SAMBROOK, J.; FRISTCH E.F.; MANIATIS T.. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, Third ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 2001.

SANTOS, K.B.; NEVES, P.; MENEGUIM, A.M.; SANTOS, R.B.; SANTOS, W.J.; VILAS-BÔAS, G.; DUMAS, V.; MARTINS, E.; PRAÇA, L.B.; QUEIROZ, P.; BERRY, C.; MONNERAT, R. Selection and characterization of the *Bacillus thuringiensis* strains toxic to *Spodoptera eridania* (Cramer), *Spodoptera cosmioides* (Walker) and *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Biological Control** 50: 157 – 163, 2009.

SCHNEPF, H. E.; WONG, H. C.; WHITELEY, H.R. The amino acid sequence of a crystal protein from *Bacillus thuringiensis* deduced from the DNA base sequence. **Journal of Biological Chemistry**, 260 (10): 6264 – 6272, 1985.

SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology Molecular Biology**, 62, 775 – 806, 1998.

SHIN, B.S.; PARK, S.H.; CHOI, S.K.; KOO, B.T.; LEE, S.T.; KIM, J.I. 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 Environmental Microbiology**, 61 (6): 2402 – 2407, 1995.

SONG, F.P.; ZHANG, J.; GU, A.X. HUANG, D. LI, G. 2003. A novel Cry1Ia endotoxin. Disponível em < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?cmd=Retrieve&db=protein&dopt=GenPept&ist_uids=14537812>. Acesso em set., 2012.

SONG, F.P.; ZHANG, J.; GU, A.X. Identification of *cry1I*-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains and characterization of a novel *cry1I*-type gene. **Applied Environmental Microbiology**, 69 (9): 5207 – 5211, 2003.

SONG, P.; WANG, Q.; NANGONG, Z. 2012. Direct submission. Disponível em < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/408795039> >. Acesso em fev. 2013.

SONG, P.; WANG, Q.; NANGONG, Z. 2012. Direct submission. Disponível em < http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/ >. Acesso em fev. 2013.

SONG, P.; WANG, Q.; NANGONG, Z. 2012. Direct submission. Disponível em < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/408795043> >. Acesso em fev. 2013.

TAILOR, R.; TIPPETT, J.; GIBB, G.; PELLIS, S.; JORDAN, L.; ELY, S. Identification and Characterization of a Novel *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin Entomocidal to Coleopteran and Lepidopteran Larvae. **Molecular Microbiology**, 6, 1211 – 1217, 1992.

TALUIL, P. L. Controle de doenças transmitidas por vetores no Sistema Único de Saúde. *Informativo Epidemiológico SUS*. Brasília, v.11, n.2, p. 59-60, 2002.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. 2011. MEGA 5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* (submitted).

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

VILAS-BÔAS, G.T., LEMOS, M.V.F. Diversity of cry genes and genetic characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from Brazil. **Canadian Journal of Microbiology**, 50: 605 – 613, 2004.

ZHAO, K.; ZHOU, C.; FAN, D.; HAN, L. 2010. A novel insecticidal crystal protein gene from *Bacillus thuringiensis* strain BF-4. Disponível em < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/301641366> >. Acesso em set. 2012.

ANEXOS

Tabela 1 – Indicação do número e tipo de mutações entre a sequência do gene *cry1la* e da proteína Cry1la de *B. thuringiensis* BR145 e sequências de genes *cry1la* e de proteínas Cry1la depositadas no banco de sequências de genes *cry* (Crickmore et al. 2013).

Gene (Acesso)	Nº de mutações	Transição	Transversão	Deleção	Tamanho do gene (pb)	Número de aa	Nº de aa alterados	Alteração de aa (Posição)
<i>cry1la1</i> (CAA44633)	4	1	3		2160	719	3	D/Y, S/F, */Y (233, 530, 599)
<i>cry1la2</i> (AAA22354)	4	2	2		2160	719	2	S/F, */Y (530, 599)
<i>cry1la3</i> (AAC36999)	6	1	5		2160	719	5	D/Y, S/F, */Y K/N, Q/E (233, 530, 599, 711, 712)
<i>cry1la4</i> (AAB00958)	5	3	2		2160	719	3	A/V, S/F, */Y (443, 530, 599)
<i>cry1la5</i> (CAA70124)	7	3	4		2160	719	5	K/R, S/F, */Y, K/N, Q/E (159, 530, 599, 711, 712)
<i>cry1la6</i> (AAC26910)	6	3	3		2160	719	3	S/F, N/K, */Y (530, 552, 599)
<i>cry1la7</i> (AAM73516)	40	22	18		2160	719	29	*
<i>cry1la8</i> (AAK66742)	4	1	3		2160	719	3	H/Q, S/F, */Y (413, 530, 599)

<i>cry1la9</i> (AAQ08616)	6	2	4	2166	719	3	Q/P, S/F, *Y (6, 530, 599)	
<i>cry1la10</i> (AAP86782)	3	1	2	2456	719	2	S/F, *Y (530, 599)	
<i>cry1la11</i> (CAC85964)	5	1	4	2160	719	4	S/F, *Y, K/N, Q/E (530, 599, 711, 712)	
<i>cry1la12</i> (AAV53390)	5	3	2	2160	719	3	K/R, S/F, *Y (159, 530, 599)	
<i>cry1la13</i> (ABF83202)	6	3	3	2160	719	5	K/N, S/F, N/S, *Y, F/S (514, 530, 578, 599, 602)	
<i>cry1la14</i> (ACG63871)	3	1	2	2160	719	2	S/F, *Y (530, 599)	
<i>cry1la15</i> (FJ617445)	10	2	8	2160	719	7	F/V, S/F, *Y, D/V, F/N, K/N, Q/E (169, 530, 599, 652, 653, 711, 712)	
<i>cry1la16</i> (FJ617448)	10	5	5	2160	719	5	V/L, S/F, *Y, A/G, Q/G (18, 530, 599, 710, 712)	
<i>cry1la17</i> (GU989199)	9	5	4	2160	719	5	Q/P, S/F, *Y, E/V, Y/H (6, 530, 599, 650, 679)	
<i>cry1la18</i>	155	94	61	1	2129	705	61	*

(ADK23801)							(posição 2077)	
<i>cry1la30</i> (JQ317686)	10	6	4	2157	719	7	Q/P, , M/I, L/S, V/D, N/S, S/F, *Y (6, 282, 411, 415, 465, 530, 599)	
<i>cry1la31</i> (JX944038)	8	4	4	2169	722	4	S/P, F/L, S/F, *Y (232, 275, 530, 599)	
<i>cry1la32</i> (JX944039)	10	6	4	2153	717	8	L/P, K/R, G/R, N/S, S/F, D/Y, *Y, F/S (93, 172, 211, 332, 530, 546, 599, 653)	
<i>cry1la33</i> (JX944040)	11	7	4	2169	722	4	N/S, R/H, T/I, S/F, *Y (99, 223, 280, 530, 599)	
<i>cry1lb1</i> (AAA82114)	140	88	52	2160	719	52	*	
<i>cry1lb2</i> (ABW88019)	159	91	68	2160	719	56	*	
<i>cry1lb3</i> (ACD75515)	142	86	56	2160	719	51	*	
<i>cry1lb4</i> (HM051227)	166	98	68	2160	719	54	*	

<i>cry1lb6</i> (ADK38579)	179	107	72	1	2110	702	60	*
<i>cry1lc1</i> (AAC62933)	168	81	87		2160	719	76	*
<i>cry1ld1</i> (AAD44366)	184	121	63		2160	719	104	*

Fonte: NCBI, 2013

*Aminoácidos e posições listados na tabela complementar.

Tabela complementar – Listagem de aminoácidos e suas posições referentes a sequências com maior número de alterações.

Gene (Acesso)	Aminoácidos (Posição)
<i>cry1la7</i> (AAM73516)	Q/P, M/Y, D/E, G/S, R/K, N/K, Q/L, M/V, A/S, H/N, P/A, T/A, A/T, A/S, K/R, T/M, I/T, A/T, S/F, L/I, *Y, L/S, R/G, D/N, K/T, D/E, D/N, I/T, E/G (6, 45, 65, 140, 150, 262, 281, 282, 289, 306, 307, 310, 324, 327, 364, 373, 376, 460, 530, 571, 599, 614, 670, 675, 677, 678, 693, 715, 716)
<i>cry1la18</i> (ADK23801)	Q/P, F/L, S/A, Q/K, I/M, H/N, C/Y, K/R, Y/H, N/S, V/I, E/D, V/I, N/S, S/L, T/S, K/R, D/E, G/K, S/N, S/A, A/T, G/R, E/K, R/K, Q/L, M/V, A/S, H/N, P/Q, S/A, T/A, I/T, P/Q, L/W, V/P, H/L, P/L, I/V, A/T, S/P, S/F, L/V, *Y, F/L, ,QS, Y/H, K/E, R/G, D/N, K/T, D/E, D/M, E/N, F/-, YQS, L/I, D/S, E/M, L/N, F/Y, E/S, I/R (6, 12, 22, 35, 37, 39, 42, 44, 48, 50, 51, 52, 82, 99, 117, 126, 129, 140, 147, 160, 214, 228, 229, 252, 262, 281, 282, 289, 306,

307, 308, 310, 330, 332, 341, 364, 367, 369, 373, 376, 392, 404, 428, 430, 440, 445, 460, 519, 530, 571, 599, 613, 614, 651, 659, 670, 675, 677, 678, 693)

<i>cry1Ib1</i> (AAA82114)	Q/P, F/L, S/A, Q/K, I/M, H/N, C/Y, K/R, Y/H, N/S, V/I, E/D, V/F, N/S, S/L, T/S, K/R, D/E, G/E, S/N, S/A, A/T, G/R, Y/F, S/N, E/K, R/K, Q/L, M/V, A/S, H/N, P/Q, S/A, T/A, Y/I, N/S, Q/K, H/R, F/S, T/P, T/A, I/T, P/Q, V/P, H/L, P/L, I/V, A/T, S/F, *Y, V/I, L/S (6, 12, 22, 35, 36, 38, 41, 43, 48, 50, 51, 52, 82, 99, 117, 126, 129, 140, 147, 160, 214, 228, 229, 236, 240, 252, 262, 281, 282, 289, 306, 307, 308, 310, 330, 332, 341, 364, 367, 369, 373, 376, 392, 428, 430, 440, 445, 460, 530, 599, 605, 614)
<i>cry1Ib2</i> (ABW88019)	Q/P, F/L, S/A, Q/K, I/M, H/N, C/Y, K/R, Y/H, N/S, V/I, E/D, S/R, V/F, N/S, S/L, L/P, T/S, K/R, D/E, G/E, S/N, S/A, A/T, G/R, Y/F, S/N, E/K, R/K, Q/L, M/V, A/S, H/N, P/Q, S/A, T/A, Y/I, N/S, Q/K, F/S, T/P, T/A, I/T, P/Q, L/W, V/P, H/L, P/L, I/V, A/T, S/F, N/K, *Y, V/I, S/G, L/S (6, 12, 22, 35, 36, 38, 41, 43, 48, 50, 51, 52, 56, 82, 99, 117, 125, 126, 129, 140, 147, 160, 214, 228, 229, 236, 240, 252, 262, 281, 282, 289, 306, 307, 308, 310, 330, 332, 341, 367, 369, 373, 376, 392, 404, 428, 430, 440, 445, 460, 530, 586, 599, 605, 612, 614)
<i>cry1Ib3</i> (ACD75515)	F/L, S/A, Q/K, I/M, H/N, C/Y, K/R, Y/H, N/S, V/I, E/D, V/F, N/S, S/L, T/S, K/R, D/E, G/E, S/N, S/A, A/T, G/R, Y/F, S/N, E/K, R/K, Q/L, M/V, A/S, H/N, P/Q, S/A, T/A, Y/I, N/S, Q/K, F/S, T/P, T/A, I/T, P/Q, L/W, V/P, H/L, P/L, I/V, A/T, S/F, *Y, V/I, L/S (12, 22, 35, 36, 38, 41, 43, 48, 50, 51, 52, 56, 82, 99, 117, 125, 126, 129, 140, 147, 160, 214, 228, 229, 236, 240, 252, 262, 281, 282, 289, 306, 307, 308, 310, 330, 332, 341, 367, 369, 373, 376, 392, 404, 428, 430, 440, 445, 460, 530, 599, 605, 614)
<i>cry1Ib4</i> (HM051227)	Q/P, F/L, S/A, Q/K, I/M, C/F, K/R, Y/H, N/S, V/I, E/D, V/F, N/S, N/D, S/L, K/I, T/A, D/E, V/I, G/K, T/A, S/N, S/A, A/T, G/R, Y/F, S/N, E/K, R/K, Q/L, M/V, A/S, H/N, P/Q, S/A, T/A, Y/I, N/S, Q/K, F/S, T/P, T/A, I/T, P/Q, L/W, V/P, H/L, P/L, I/V, A/T, S/F, *Y, V/I, L/S

(6, 12, 22, 35, 36, 38, 41, 43, 48, 50, 51, 52, 56, 82, 99, 113, 117, 123, 125, 126, 140, 146, 147, 152, 160, 214, 228, 229, 236, 240, 252, 262, 281, 282, 289, 306, 307, 308, 310, 330, 332, 341, 367, 369, 373, 376, 392, 404, 428, 430, 440, 445, 460, 530, 586, 599, 605, 614)

cry1Ib6
(ADK38579) Q/P, F/L, S/A, Q/K, I/M, H/N, C/Y, K/R, Y/H, N/S, V/I, E/D, V/F, N/S, S/L, T/S, K/R, D/E, G/E, S/N, S/A, A/T, G/R, S/N, E/K, R/K, Q/L, M/V, A/S, H/N, P/Q, S/A, T/A, Y/I, N/S, Q/K, F/S, T/P, T/A, I/T, P/Q, L/W, V/P, H/L, P/L, I/V, A/T, S/P, S/F, L/V, *Y, V/I, F/L, L/S, Y/H, K/E, R/G, D/N, K/T, D/E

(6, 12, 22, 35, 36, 38, 41, 43, 48, 50, 51, 52, 56, 82, 99, 117, 125, 126, 129, 140, 147, 160, 214, 228, 229, 236, 240, 252, 262, 281, 282, 289, 306, 307, 308, 310, 330, 332, 341, 367, 369, 373, 376, 392, 404, 428, 430, 440, 445, 460, 519, 530, 571, 586, 599, 605, 613, 614, 651, 659, 670, 675, 677, 678)

cry1Ic1
(AAC62933) Q/P, S/T, F/L, S/A, Q/K, I/M, H/N, C/Y, K/R, Y/H, N/S, V/I, E/D, A/P, V/F, N/S, E/A, Q/R, S/L, D/E, S/N, G/E, E/N, W/G, S/A, A/T, G/R, D/Y, Y/F, Y/N, S/N, G/A, A/G, E/Q, R/K, M/I, T/E, A/R, L/V, Q/L, M/V, A/S, H/D, H/N, P/Q, S/A, F/L, T/R, Y/I, N/S, Q/K, F/S, T/P, T/A, I/T, P/Q, V/F, L/W, V/P, H/L, P/L, I/V, A/T, A/G, S/F, D/H, N/K, T/S, D/H, I/M, *Y, V/I, L/S, R/S, D/G, F/L

(6, 11, 12, 22, 35, 36, 38, 41, 43, 48, 50, 51, 52, 56, 79, 82, 99, 110, 114, 117, 125, 126, 129, 140, 147, 160, 207, 209, 210, 214, 228, 229, 233, 236, 239, 240, 248, 251, 252, 262, 264, 265, 273, 274, 281, 282, 289, 304, 306, 307, 308, 309, 310, 330, 332, 341, 367, 369, 373, 376, 392, 398, 404, 428, 430, 440, 445, 460, 481, 530, 534, 540, 541, 546, 563, 564, 586, 599, 605, 614, 636, 695)

cry1Id1
(AAD44366) L/S, Q/P, D/N, K/M, HQY, Q/R, F/L, K/T, I/S, S/F, S/P, K/E, N/H, E/N, D/N, I/M, Q/K, I/S, H/N, C/Y, K/R, Y/H, N/S, V/I, E/D, A/V, T/N, V/F, N/S, I/K, S/L, T/A, D/E, V/I, G/E, A/V, S/N, S/E, V/S, E/S, R/Q, A/T, G/Q, D/E, H/Y, V/S, K/E, S/N, N/R, E/K, R/K, Q/R, M/V, K/P, T/S, A/S, H/N, P/A, S/A, T/A, A/T, Y/I, N/S, Q/K, F/S, T/P, T/A, I/T, P/Q, V/P, H/L, P/L, I/V, A/T, E/N, P/S, N/D, S/P, A/S, S/F, R/Q, V/L, D/N, Q/E, *Y, T/A, V/I, L/S, D/N, V/A, S/L, F/L, E/K, E/D, K/E, V/I, L/M, P/L, G/R, D/N, K/T, Y/C, I/L, H/N

(3, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 17, 21, 22, 25, 27, 28, 29, 31, 32, 35, 36, 38, 41, 43, 48, 50, 51, 52, 56, 57, 73, 79, 82, 99, 110, 111, 114, 117, 125, 126, 140, 147, 154, 160, 214, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 234, 236, 237, 240, 245, 281, 286, 288, 306, 307, 308, 310, 324, 330, 332, 341, 367, 369, 373, 376, 392, 428, 430, 440, 445, 460, 503, 504, 505, 519, 523, 530, 537, 561, 570, 572, 599, 601, 605, 614, 615, 629, 653, 654, 658, 659, 660, 663, 669, 671, 675, 679, 713, 714)

RESULTADOS COMPLEMENTARES

Para a clonagem e identificação do gene *cry1Ia* de *B. thuringiensis* BR09 foram realizados todas as etapas descritas para a clonagem do gene *cry1Ia* de *B. thuringiensis* BR145 constadas no artigo anterior. A sequência do gene *cry1Ia* de *B. thuringiensis* BR09 também apresentou 88% de cobertura e 97% de identidade com a sequência do gene *cry1Ia* (número de acesso X62821.1) descrita por Taylor et al. (1992) e os oligonucleotídeos desenvolvidos a partir desta sequência para a BR145 foram utilizados para amplificação deste gene na linhagem BR09. Os produtos das amplificações foram sequenciados ao menos duas vezes e a qualidade das sequências foi confirmada pelo uso do programa Sequencher v.5.1 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI). O alinhamento de todas as sequências obtidas pelos programas MEGA 5.10 e BioEdit 7.1.11 permitiu a dedução da sequência do gene *cry1Ia* para esta linhagem (Figura 1), sendo necessárias novos sequenciamentos para obtenção total da sequência, os quais serão realizadas posteriormente.

```

Query 1 ATGTT-CGCTCAATATGGAGTT--TTCGCGTATTTAACTATCTCGAATAATTCTCTCTTT 57
      ||||| |
Sbjct 2156 ATGTTACGCTCAATATGGAGTTGCTTCGCGTATTTAACTATCTCGAATAATTCTCTCTTT 2097
Query 58 TCATCAAGATAGAATTTCATCTGATAGAGACTCTACTAAATTTGATACCTGGTCAATATGA 117
      ||||| |
Sbjct 2096 TCATCAAGATAGAATTTCATCTGATAGAGACTCTACTAAATTTGATACCTGGTCAATATGA 2037
Query 118 TAATCCTTTACATCTGTTTTTAATCCTCTTGGATTCGTAGATGTAAACAGTGCAGTAACC 177
      ||||| |
Sbjct 2036 TAATCCTTTACATCTGTTTTTAATCCTCTTGGATTCGTAGATGTAAACAGTGCAGTAACC 1977
Query 178 TTCTCTTGCCTTTTTTCAAATCATATCTGCCTCATATGTTACTTCTACCGGAACAAAT 237
      ||||| |
Sbjct 1976 TTCTCTTGCCTTTTTTCAAATCATATCTGCCTCATATGTTACTTCTACCGGAACAAAT 1917
Query 238 TCAATTCTATCTATATAAACTTCGTTACCTGAAGAGAAGTTCCAAGCACCTATTGTGAAT 297
      ||||| |
Sbjct 1916 TCAATTCTATCTATATAAACTTCGTTACCTGAAGAGAAGTTCCAAGCACCTATTGTGAAT 1857
Query 298 GTACTTTGTACATCTAAAAAGCTAAATGGAGTGGTAAAGCCTACAGTTCTAAAGGTTTTTA 357
      ||||| |
Sbjct 1856 GTACTTTGTACATCTAAAAAGCTAAATGGAGTGGTAAAGCCTACAGTTCTAAAGGTTTTTA 1797

```

Query 358 TAGTCTAAGTCCTCTCCTCTATTTCATAGTTGCTGAAAAATTACCTTGATTAATAGCTTTA 417
 |||
 Sbjct 1796 TAGTCTAAGTCCTCTCCTCTATTTCATAGTTGCTGAAAAATTACCTTGATTAATAGCTTTA 1737
 Query 418 CCGTTAATTGACGTATGGAATTGTAAATCTGTGGTAGAAGCATAGCGAATCCTCACGCGA 477
 |||
 Sbjct 1736 CCGTTAATTGACGTATGGAATTGTAAATCTGTGGTAGAAGCATAGCGAATCCTCACGCGA 1677
 Query 478 TATCTTTGTGCAAATGGTGGATTAATATTTACTCGTATATCCCCAAATGTACCAGTATTC 537
 |||
 Sbjct 1676 TATCTTTGTGCAAATGGTGGATTAATATTTACTCGTATATCCCCAAATGTACCAGTATTC 1617
 Query 538 GTTCTTCGAAGGATATCCCCACCTGTAAATCCTGGTCCTCTCACTACAGCGGCACCTGAA 597
 |||
 Sbjct 1616 GTTCTTCGAAGGATATCCCCACCTGTAAATCCTGGTCCTCTCACTACAGCGGCACCTGAA 1557
 Query 598 GACAGATTGAAAGCTTTTACTAATGGTATTTGTGTAATGCTATTTGGCTCAATTGTATTT 657
 |||
 Sbjct 1556 GACAGATTGAAAGCTTTTACTAATGGTATTTGTGTAATGCTATTTGGCTCAATTGTATTT 1497
 Query 658 GTACGATCTGCACTACGATGCGTCCAAGAATATACCAATGCTTTCCACATGTGATGCTGAA 717
 |||
 Sbjct 1496 GTACGATCTGCACTACGATGCGTCCAAGAATATACCAATGCTTTCCACATGTGATGCTGAA 1437
 Query 718 ATGAGTCCTATATGAGATAATCTATGACTATAAGATTCATAATTTGGCTGTCTGTGCT 777
 |||
 Sbjct 1436 ATGAGTCCTATATGAGATAATCTATGACTATAAGATTCATAATTTGGCTGTCTGTGCT 1377
 Query 778 TCAGGTGGTAATTCATTTCTGAATCCTGTAATTGCGTCCAATTCAGCATAACCCTGGA 837
 |||
 Sbjct 1376 TCAGGTGGTAATTCATTTCTGAATCCTGTAATTGCGTCCAATTCAGCATAACCCTGGA 1317
 Query 838 TAATAGAAATTATCAGATGCGATCGGATGTGTGACGAATTTCCAATGAAAATCAACCCTA 897
 |||
 Sbjct 1316 TAATAGAAATTATCAGATGCGATCGGATGTGTGACGAATTTCCAATGAAAATCAACCCTA 1257
 Query 898 GGTACTCCATTAACAGGTTGAGTTAAAAATAGATTCAGCCCTGCCAATGATTCAGTCCTA 957
 |||
 Sbjct 1256 GGTACTCCATTAACAGGTTGAGTTAAAAATAGATTCAGCCCTGCCAATGATTCAGTCCTA 1197
 Query 958 TAGACGTCTCGAGAAGTGAACGGTAATGTTACAGGATTAATAGAAGTATTAGTAGATCCT 1017
 |||
 Sbjct 1196 TAGACGTCTCGAGAAGTGAACGGTAATGTTACAGGATTAATAGAAGTATTAGTAGATCCT 1137
 Query 1018 TGTGTTGAGATATTTAACGTTCCCTCTATTGTTCCGGAATTTCTAGTTTATGTCTCCCCAC 1077
 |||
 Sbjct 1136 TGTGTTGAGATATTTAACGTTCCCTCTATTGTTCCGGAATTTCTAGTTTATGTCTCCCCAC 1077
 Query 1078 ATATTCATATACTGAGTGTACTCCATCGACTTAATAAGCTGTAAATTTGAACTTGTCT 1137
 |||
 Sbjct 1076 ATATTCATATACTGAGTGTACTCCATCGACTTAATAAGCTGTAAATTTGAACTTGTCT 1017
 Query 1138 AGAAAATCGAGTAGATGCGGGTTTCGAACAACAGCAGCCTCTATGGCAGAGAACGAAGGT 1197
 |||

Sbjct 1016 AGAAAATCGAGTAGATGCGGGTTTCGAACAACAGCAGCCTCTATGGCAGAGAACGAAGGT 957

 Query 1198 GCATTATTATTATACCAAGTCGTACTTGTAAAACTTGGATGCGGATGTACTGTCCCAATT 1257
 |||
 Sbjct 956 GCATTATTATTATACCAAGTCGTACTTGTAAAACTTGGATGCGGATGTACTGTCCCAATT 897
 Query 1258 GCGTCTGTATATACTTCTCTTGTAAAGTTGGGCTGTAGTTTAAATTGGATACATTTGTGTA 1317
 |||
 Sbjct 896 GCGTCTGTATATACTTCTCTTGTAAAGTTGGGCTGTAGTTTAAATTGGATACATTTGTGTA 837
 Query 1318 TCATAGCTTGGAATAGTGCCACTAAATCTAGTACCATTAAAGTCATGTCTCTACGGAAT 1377
 |||
 Sbjct 836 TCATAGCTTGGAATAGTGCCACTAAATCTAGTACCATTAAAGTCATGTCTCTACGGAAT 777
 Query 1378 TGATTATATCGTACCCAACCTTTCGGCATTGTACCCCTCAAGTTATTTAGACCTGTGCTA 1437
 |||
 Sbjct 776 TGATTATATCGTACCCAACCTTTCGGCATTGTACCCCTCAAGTTATTTAGACCTGTGCTA 717
 Query 1438 TACCATTTACACAATGGTCGGAATAATCTCCTGCTCGTTCGACTTGACGGTTATAAAAT 1497
 |||
 Sbjct 716 TACCATTTACACAATGGTCGGAATAATCTCCTGCTCGTTCGACTTGACGGTTATAAAAT 657
 Query 1498 GTTGAATTTCTGAAGATGATAATCCCACTCTTTTCCAAAATAGATGCATCTCTTAAT 1557
 |||
 Sbjct 656 GTTGAATTTCTGAAGATGATAATCCCACTCTTTTCCAAAATAGATGCATCTCTTAAT 597
 Query 1558 AGCAACAAATGTAAATTTGCAGCTTGGGCATATATCGGTAATAATGGTACCTCCTCTCCA 1617
 |||
 Sbjct 596 AGCAACAAATGTAAATTTGCAGCTTGGGCATATATCGGTAATAATGGTACCTCCTCTCCA 537
 Query 1618 GACTGCAAAAGAAGGTAGTTTCTGAACGAACATCAATTCTAATGCGATATATTGGCTC 1677
 |||
 Sbjct 536 GACTGCAAAAGAAGGTAGTTTCTGAACGAACATCAATTCTAATGCGATATATTGGCTC 477
 Query 1678 TTGACAACACTCCTAGCCCTTGTGTTATTACGATTTCCAACCAACTTTCAAGCGAATCA 1737
 |||
 Sbjct 476 TTGACAACACTCCTAGCCCTTGTGTTATTACGATTTCCAACCAACTTTCAAGCGAATCA 417
 Query 1738 TGGTAGACAGCTAAGGCATCTCCTAATCCTTTCAAGTCTGTAAGTGCTTTATTTCTTGCA 1797
 |||
 Sbjct 416 TGGTAGACAGCTAAGGCATCTCCTAATCCTTTCAAGTCTGTAAGTGCTTTATTTCTTGCA 357
 Query 1798 TAAGTTGATATTTTTGATTAATAATCTCTTCTACATGTTCCATAAAGATTTCCATTGA 1857
 |||
 Sbjct 356 TAAGTTGATATTTTTGATTAATAATCTCTTCTACATGTTCCATAAAGATTTCCATTGA 297
 Query 1858 TTTTCCCCTTAGGCCATAGCTCACCTAAGATAAAACTATAAAGACTAGCTACTTGTCCCT 1917
 |||
 Sbjct 296 TTTTCCCCTTAGGCCATAGCTCACCTAAGATAAAACTATAAAGACTAGCTACTTGTCCCT 237
 Query 1918 GCAAAAGGAACGCCTAGGGTACCAAGTATTTTACCCGCAATACCAATACCTGTTTGAATT 1977
 |||
 Sbjct 236 GCAAAAGGAACGCCTAGGGTACCAAGTATTTTACCCGCAATACCAATACCTGTTTGAATT 177
 Query 1978 GTTGATGCACTAACAAACGGCTCTACATTTTCATACTCAGACATTTTCAAACAATCTTCA 2037
 |||

```

Sbjct  176  GTTGATGCACTAACAAACGGCTCTACATTTTCATACTCAGACATTTTCAAACAATCTTCA  117

Query  2038  TGATTAATGTTTTGTAATTCTATATCTGTTTCATTTTTTAGTGAATCCGTAGAGATTTTA  2097
      |||
Sbjct  116  TGATTAATGTTTTGTAATTCTATATCTGTTTCATTTTTTAGTGAATCCGTAGAGATTTTA  57
Query  2098  TCTACTTTCGCATTGCTAGAAAAACTTTGATGCTTATCTTGATTCTTTAGTTTCAT  2153
      |||
Sbjct  56  TCTACTTTCGCATTGCTAGAAAAACTTTGATGCTTATCTTGATTCTTTAGTTTCAT  1

```

Figura 1 – Alinhamento da sequência parcial de nucleotídeos do gene *cry1la* de *B. thuringiensis* BR09 com a sequência de nucleotídeos do gene *cry1la14* (acesso: ACG63871) (Liu & Guo, 2008).

A sequência parcial do gene *cry1la* obtido para *B. thuringiensis* BR09 apresenta um total de 2153 pb. O alinhamento dessa sequência com as de outros genes *cry1la* apresentou uma cobertura de 100% e identidade de 99% em relação aos demais genes *cry1la* depositados no banco de sequências de genes *cry*, com exceção ao gene *cry1la7* (Porcar et al., 2006) que foi observada uma identidade de 97% (NCBI, 2013). Em relação a sequência do gene *cry1la* de *B. thuringiensis* BR145, apresentou 99% de identidade sendo observado duas mutações pontuais; uma transição de C para T na posição 1589 e uma transversão de A para T na posição 1797.

O alinhamento global da sequência do gene *cry1la* de *B. thuringiensis* BR09 com sequências de outros genes *cry1l* depositadas no NCBI revelou algumas mutações pontuais (Tabela 1) que serão investigadas posteriormente.

Tabela 1 – Indicação do número e tipo de mutações entre a sequência do gene *cry1la* de *B. thuringiensis* BR09 e sequências do gene *cry1la* depositadas no banco de sequências de genes *cry* (Crickmore et al., 2013).

Gene (Acesso)	Nº de mutações	Transição	Transversão	Deleção	Tamanho do gene	aa ¹
<i>cry1la1</i> (CAA44633)	1		1		2160	719
<i>cry1la2</i>	1	1			2160	719

(AAA22354)						
<i>cry1la3</i> (AAC36999)	3	3			2160	719
<i>cry1la4</i> (AAB00958)	2	2			2160	719
<i>cry1la5</i> (CAA70124)	4	2	2		2160	719
<i>cry1la6</i> (AAC26910)	3	2	1		2160	719
<i>cry1la7</i> (AAM73516)	58	32	26		2160	719
<i>cry1la8</i> (AAK66742)	2	1	1		2160	719
<i>cry1la9</i> (AAQ08616)	1	1			2166	719
<i>cry1la10</i> (AAP86782)	0				2456	719
<i>cry1la11</i> (CAC85964)	2		2		2160	719
<i>cry1la12</i> (AAV53390)	2	2			2160	719
<i>cry1la13</i> (ABF83202)	3	2	1		2160	719
<i>cry1la14</i> (ACG63871)	0				2160	719
<i>cry1la15</i> (FJ617445)	7	1	6		2160	719
<i>cry1la16</i> (FJ617448)	8	5	3		2160	719
<i>cry1la17</i> (GU989199)	8	7	1		2160	719
<i>cry1la18</i> (ADK23801)	163	102	60	1 (posição 2077)	2129	705
<i>cry1la30</i> (JQ317686)	7	5	2		2157	719
<i>cry1la31</i> (JX944038)	3	3			2169	722
<i>cry1la32</i> (JX944039)	7	5	2		2153	717
<i>cry1la33</i> (JX944040)	6	6			2169	722

Fonte: NCBI, 2013

Atualmente são descritos 30 tipos de genes *cry1la* (Crickmore et al., 2013). Para a identificação do tipo de gene *cry1la* presente em *B. thuringiensis* BR09, foi feito um alinhamento múltiplo das sequências, pelo uso do programa MEGA 5.10, o que permitiu a construção de um dendrograma. O grupo A agrupou as sequências do gene de *B. thuringiensis* BR09 e dos genes *cry1la* (com exceção do *cry1la18*). A

identidade observada entre a sequência de *B. thuringiensis* BR09 com as demais sequências foi de 99%, com exceção do gene *cry1la7* descrito por Porcar et al. (2006) que obteve identidade de 97%. Esta diferença na identidade pode ser explicada pelo número de mutações presentes nesta sequência em relação as demais sequências do grupo *cry1la* (Tabela 1). A comparação da sequência de *B. thuringiensis* BR09 com as sequências agrupadas no grupo B, o qual foi composto pelos genes *cry1la18* (Li et al., 2010), *cry1lb1* (Shin et al., 1995), *cry1lb2* (Guan et al., 2007), *cry1lb3* (Liu & Guo et al., 2008), *cry1lb4* (Zhao et al., 2010), *cry1lb6* (Li et al., 2010), *cry1lc1* (Osman et al., 1998), resultou em 93% e 92% de identidade. A sequência para *cry1ld1* (Choi et al., 2000) apresentou identidade de 91% com a de *B. thuringiensis* BR09 e foi utilizada como raiz para a construção do dendograma (Figura 2).

A partir da sequência parcial do gene *cry1la* da linhagem BR09 ,foi deduzida a sequência parcial de aminoácidos, a qual é composta por um total de 711 aminoácidos (Figura 3).

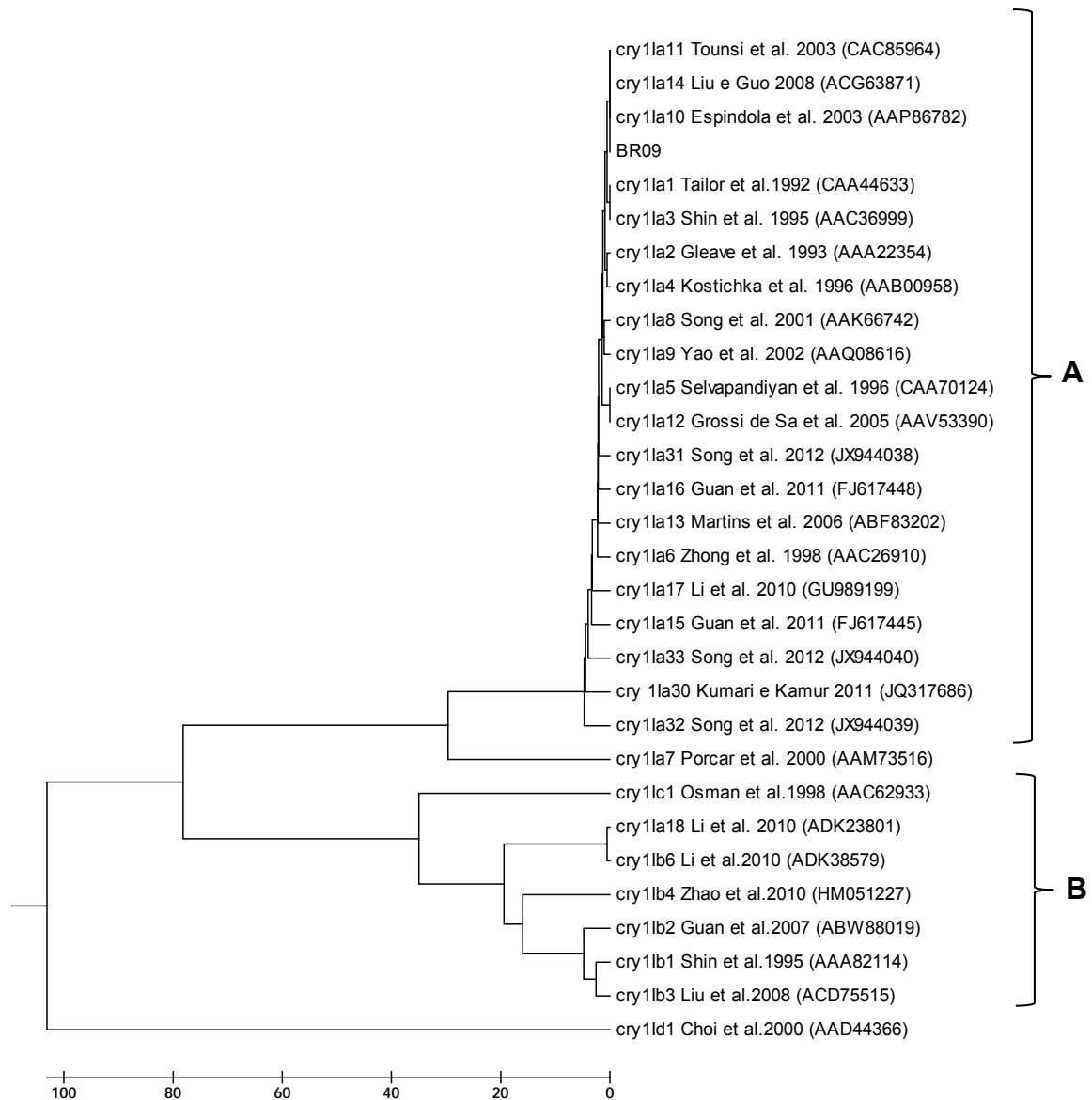


Figura 2 – Dendrograma do alinhamento entre a sequência do gene *cry1Ia* da linhagem BR09 com demais sequências do gene *cry1I* mostrando a similaridade entre elas.

1 ATGTT-CGCTCAATATGGAGTT--TTCGCGTATTTAACTATCTCGAATAATTCTCTCTTT 57
M K L K N Q D K H Q S F S S N A K V D K
58 TCATCAAGATAGAATTCATCTGATAGAGACTCTACTAAATTTGATACCTGGTCAATATGA 117
I S T D S L K N E T D I E L Q N I N H E
118 TAATCCTTTTACATCTGTTTTTAATCCTCTTGGATTTCGTAGATGTAAACAGTGCAGTAACC 177
D C L K M S E Y E N V E P F V S A S T I
178 TTCTCTTGCGCTTTTTTCAAATCATATTCTGCCTCATATGTTACTTCTACCGGAACAAAT 237
Q T G I G I A G K I L G T L G V P F A G
238 TCAATTCTATCTATATAAACTTCGTTACCTGAAGAGAAGTTCCAAGCACCTATTGTGAAT 297
Q V A S L Y S F I L G E L W P K G K N Q
298 GTACTTTGTACATCTAAAAAGCTAAATGGAGTGGTAAAGCCTACAGTTCTAAAGGTTTTA 357
W E I F M E H V E E I I N Q K I S T Y A
358 TAGTCTAAGTCTCTCCTCTATTCATAGTTGCTGAAAAATTACCTTGATTAATAGCTTTA 417
R N K A L T D L K G L G D A L A V Y H D
418 CCGTTAATTGACGTATGGAATTGTAATCTGTGGTAGAAGCATAGCGAATCCTCACGCGA 477
S L E S W V G N R N N T R A R S V V R S
478 TATCTTTGTGCAAATGGTGGATTAATATTTACTCGTATATCCCCAAATGTACCAGTATTC 537
Q Y I A L E L M F V Q K L P S F A V S G
538 GTTCTTCGAAGGATATCCCCACCTGTAAATCCTGGTCTCTCACTACAGCGGCACCTGAA 597
E E V P L L P I Y A Q A A N L H L L L L
598 GACAGATTGAAAGCTTTTACTAATGGTATTTGTGTAATGCTATTTGGCTCAATTGTATTT 657
R D A S I F G K E W G L S S S E I S T F
658 GTACGATCTGCACTACGATGCGTCCAAGAATATACCAATGCTTTCACATGTGATGCTGAA 717
Y N R Q V E R A G D Y S D H C V K W Y S
718 ATGAGTCCTATATGAGATAATCTATGACTATAAGATTCATAATTTGGCTGTCCTGTTGCT 777
T G L N N L R G T N A E S W V R Y N Q F
778 TCAGGTGGTAATTCATTTTCTGAATCCTGTAAATGCGTCCCAATTCAGCATACCTGGA 837
R R D M T L M V L D L V A L F P S Y D T
838 TAATAGAAATTATCAGATGCGATCGGATGTGTGACGAATTTCCAATGAAATCAACCCTA 897
Q M Y P I K T T A Q L T R E V Y T D A I
898 GGTACTCCATTAACAGGTTGAGTTAAAAATAGATTCAGCCCTGCCAATGATTGAGTCCTA 957
G T V H P H P S F T S T T W Y N N N A P
958 TAGACGTCTCGAGAAGTGAACGGTAATGTTACAGGATTAATAGAAGTATTAGTAGATCCT 1017
S F S A I E A A V V R N P H L L D F L E
1018 TGTGTTGAGATATTTAACGTTCCCTCCTATTGTTTCGGAATTCAGTTTATGTCCTCCCCAC 1077
Q V T I Y S L L S R W S N T Q Y M N M W
1078 ATATTCATATACTGAGTGTTACTCCATCGACTTAATAAGCTGTAAATTGTAACCTGTTCT 1137
G G H K L E F R T I G G T L N I S T Q G
1138 AGAAAATCGAGTAGATGCGGGTTTCGAACAACAGCAGCCTCTATGGCAGAGAACGAAGGT 1197
S T N T S I N P V T L P F T S R D V Y R
1198 GCATTATTATTATACCAAGTCGACTTGTAAAACCTGGATGCGGATGTACTGTCCCAATT 1257

T E S L A G L N L F L T Q P V N G V P R

1258 GCGTCTGTATATACTTCTCTTGTAAAGTTGGGCTGTAGTTTAAATTGGATACATTTGTGTA 1317
V D F H W K F V T H P I A S D N F Y Y P

1318 TCATAGCTTGAAATAGTGCCACTAAATCTAGTACCATTAAAGTCATGTCTCTACGGAAT 1377
G Y A G I G T Q L Q D S E N E L P P E A

1378 TGATTATATCGTACCCAACTTTTCGGCATTGTACCCCTCAAGTTATTTAGACCTGTGCTA 1437
T G Q P N Y E S Y S H R L S H I G L I S

1438 TACCATTTCACACAATGGTCGGAATAATCTCCTGCTCGTTCGACTTGACGGTTATAAAAAT 1497
A S H V K A L V Y S W T H R S A D R T N

1498 GTTGAAATTTCTGAAGATGATAATCCCCACTCTTTTCCAAAAATAGATGCATCTCTTAAT 1557
T I E P N S I T Q I P L V K A F N L S S

1558 AGCAACAAATGTAAATTTGCAGCTTGGGCATATATCGGTAATAATGGTACCTCCTCTCCA 1617
G A A V V R G P G F T G G D I L R R T N

1618 GACACTGCAAAAGAAGGTAGTTTCTGAACGAACATCAATTCTAATGCGATATATTGGCTC 1677
T G T F G D I R V N I N P P F A Q R Y R

1678 TTGACAACACTCCTAGCCCTTGTGTTATTACGATTTCCAACCCAACTTTCAAGCGAATCA 1737
V R I R Y A S T T D L Q F H T S I N G K

1738 TGGTAGACAGCTAAGGCATCTCCTAATCCTTTCAAGTCTGTAAGTGCTTTATTTCTTGCA 1797
A I N Q G N F S A T M N R G E D L D Y K

1798 TAAGTTGATATTTTTTGATTAATAATCTCTTCTACATGTTCATAAAGATTTCCCATGTA 1857
T F R T V G F T T P F S F L D V Q S T F

1858 TTTTCCCCTTAGGCCATAGCTCACCTAAGATAAAACTATAAAGACTAGCTACTTGTGCCT 1917
T I G A W N F S S G N E V Y I D R I E F

1918 GCAAAAGGAACGCCTAGGGTACCAAGTATTTTACCCGCAATACCAATACCTGTTTGAATT 1977
V P V E V T Y E A E Y D F E K A Q E K V

1978 GTTGATGCACTAACAAACGGCTCTACATTTTCATACTCAGACATTTTCAAACAATCTTCA 2037
T A L F T S T N P R G L K T D V K D Y H

2038 TGATTAATGTTTTGTAATCTATATCTGTTTCATTTTTTAGTGAATCCGTAGAGATTTTA 2097
I D Q V S N L V E S L S D E F Y L D E K

2098 TCTACTTTCGCATTGCTAGAAAACTTTGATGCTTATCTTGATTCTTTAGTTTCAT 2153
R E L F E I V K Y A K

Figura 3 - Sequência de nucleotídeos do gene *cry1la* de *B. thuringiensis* BR09 com a sequência deduzida de aminoácidos.

O gene inteiro *cry1la* de *B. thuringiensis* BR09 foi clonado e novas reações de sequenciamento serão realizadas visando a confirmação das alterações encontradas na sequência do gene *cry1la* de *B. thuringiensis* BR09 e a obtenção completa de sua sequência e, permanecendo a confirmação desses resultados, a

sequência desse gene será proposta para ser classificada com um novo gene *cry1la* seguindo critérios de classificação proposto por Crickmore e colaboradores (1998).