



ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE UM GENE DE *Bacillus thuringiensis* ATIVO CONTRA INSETOS DAS ORDENS COLEOPTERA E LEPDOPTERA

Érica Soares Martins (Embrapa Cenargen / erica@cenargen.embrapa.br), Raimundo Wagner de S. Aguiar (Embrapa Cenargen / UnB), Natália F. Martins (Embrapa Cenargen), Andréa Cardoso Batista (Embrapa Cenargen), Viviane M. Melatti (Embrapa Cenargen), Ana Cristina M. M. Gomes (Embrapa Cenargen), Rosana Falcão (Embrapa Cenargen), Bergmann Morais Ribeiro (UnB), Rose Gomes Monnerat (Embrapa Cenargen).

RESUMO - O algodão é uma das mais importantes culturas brasileiras e é hospedeiro de um grande número de pragas, como *Spodoptera frugiperda* e *Anthonomus grandis*. Uma alternativa para o controle desses insetos é a construção de um algodão transgênico, contendo gene(s) de resistência a esses insetos. *Bacillus thuringiensis* é uma bactéria que produz toxinas entomopatogênicas. O objetivo deste trabalho foi o isolamento e a caracterização de um gene de uma estirpe de *B. thuringiensis* tóxica a esses insetos. Após a clonagem e expressão do gene, identificado como *cry1la* em sistema baculovírus, foram realizados bioensaios, onde foi verificada alta toxicidade da proteína produzida a larvas de *S. frugiperda* e *A. grandis*. Este gene é bastante promissor para a construção de uma nova cultivar resistente a insetos-praga.

Palavras-chave: *cry1la*, *Anthonomus grandis*, *Spodoptera frugiperda*.

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF *Bacillus thuringiensis* GENE ACTIVE AGAINST COLEOPTERA AND LEPDOPTERA

ABSTRACT - The cotton is one of the most important crops in Brazil and it is the host of many pests, like *Spodoptera frugiperda* and *Anthonomus grandis*. One of the alternatives to control these insects is the development of transgenic cotton expressing a gene offering resistance to insects. *Bacillus thuringiensis* is a bacterium that produces entomopathogenic toxins. The aim of this work was the isolation and characterization of a gene present in a *B. thuringiensis* toxic strain. After gene cloning and expression of *cry1la* in a baculovirus system, bioassays were performed. These bioassays confirmed the high toxicity to this protein to *S. frugiperda* and *A. grandis* larvae. This gene is very promising to be used in the development of a new variety of cotton resistant to pests.

Key words: *cry1la*, *Anthonomus grandis*, *Spodoptera frugiperda*.

INTRODUÇÃO

Bacillus thuringiensis (Bt) é uma bactéria de solo, aeróbia, Gram positiva, da família *Bacillaceae*, que se caracteriza pela produção de inclusões protéicas cristalinas no momento de sua esporulação. É uma bactéria de ocorrência ubíqua (KRYWUNCZYK e FAST, 1980), em vários substratos como solo, água, superfície de plantas, insetos mortos, teias de aranha e grãos armazenados (BRAVO *et al.*, 1998).

A atividade entomopatogênica desta bactéria se deve à presença das inclusões protéicas cristalinas, produzidas durante a esporulação. Esses cristais compostos por proteínas denominadas δ- δ -endotoxinas ou proteínas Cry podem ser visualizados por microscopia de luz com contraste de fases (BRAVO *et al.*, 1998; MONNERAT e BRAVO, 2000).



O algodão é uma das plantas de maior interesse econômico cultivada em nível mundial. A cadeia produtiva do algodão é uma das principais do Brasil e do mundo, gerando milhares de empregos diretos e indiretos e movimentando apenas na indústria aproximadamente US\$ 1,5 bilhão (FREIRE *et al*, 1997). Na década de 1990, essa planta superava o preço de outros produtos também importantes como a soja, milho e trigo (PONCHIO, 2001). Na indústria têxtil, a fibra do algodão é reconhecida como a mais importante e de maior valor de mercado.

A cultura do algodão tem sido alvo de ataque de diversas pragas dentre elas destacam-se: Lagarta militar: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) e o Bicudo do algodoeiro: *Anthonomus grandis* (Coleoptera, Curculionidae), que é considerada uma das mais danosas.

S. frugiperda é uma espécie polífaga que ataca diversas culturas economicamente importantes em vários países. Na lavoura algodoeira danificam o caule, folhas, botões florais e maçãs. O ataque se inicia a partir da parte mediana das plantas e continua subindo até o ponteiro

O bicudo do algodoeiro não é passível de controle por métodos convencionais, pois, suas larvas são endofíticas desenvolvendo-se dentro dos botões florais. Os adultos se alimentam principalmente de pólen e furam o botão floral para depositar os ovos. Os danos causados por esta praga, ocasionam uma drástica redução da produtividade, devido à perda de botões florais que caem após o ataque, diminuindo significativamente o número de capulhos na colheita.

O mecanismo de resistência de plantas a fitófagos tem sido amplamente estudado para vários microorganismos e insetos. Nos últimos 20 anos, grupos de pesquisas em todo o mundo vêm tentando conseguir, por meio de melhoramento tradicional, cultivares de algodão resistentes ao bicudo, porém, os resultados obtidos não são significativos para solucionar este problema. Entretanto, uma nova perspectiva surgiu com a possibilidade de obtenção de um algodão transgênico, contendo gene ou genes que conferem resistência ao bicudo. Uma das principais vantagens do algodão transgênico é a redução de insumos químicos para o estabelecimento da lavoura. A adoção de algodão Bt pelos agricultores do México e EUA contribuiu para redução de 50% nas aplicações de inseticidas Na Argentina, a redução do uso de inseticidas alcançou 65% (dos Santos, 2003).

Várias áreas de pesquisa vêm estudando estratégias que selecionem formas resistentes de plantas a insetos. Na área molecular, as toxinas microbianas inseto-específicas são uma alternativa. Um dos organismos mais estudados e utilizados é o *B. thuringiensis*. Com isso, uma mesma planta poderia expressar diferentes genes, ou um único gene que codifique uma proteína com dupla atividade.

O objetivo deste trabalho foi isolar, caracterizar e expressar o gene *cry1la*, derivado da estirpe de *Bacillus thuringiensis* S1451, pertencente ao Banco de *Bacillus* spp. Entomopatogênicos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e analisar a atividade inseticida da proteína recombinante, expressa em células de inseto, para o bicudo do algodoeiro e para lagarta do cartucho-do-milho.

MATERIAL E MÉTODOS

Primeiramente, o gene foi amplificado por PCR, usando oligonucleotídeos específicos a partir do DNA da estirpe S1451 e depois clonado em vetor de clonagem PgenT-easy (Promega). O clone foi seqüenciado e a análise de BLAST. O gene *cry1la* foi, então, inserido no vetor pSynXIVVI+X3 (Wang *et al.*, 1991) e células de *Tricoplusia ni* foram co-transfectadas com 1mg do DNA linearizado do vírus *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus (AcMNPV) (digerido com a enzima EcoRI), usando uma solução de lipossomos (Lipofectin, Gibco BRL) e, este foi propagado em células de *Trichoplusia ni*. O



vírus recombinante vAcvBtCry1Ia foi purificado pelo método de diluição seriada em placa de 96 poços, como descrito por O'Reilly *et al.* (1992).

Após purificação viral, larvas de terceiro instar de *S. frugiperda* foram infectadas com o vírus recombinante, a fim de que ocorresse a expressão do gene *cry1Ia*. O Extrato das lagartas, contendo a toxina, foi testado contra larvas neonatas de *A. grandis* e lagartas de segundo instar de *S. frugiperda*. Para confirmação da expressão da proteína Cry1Ia foi feito um ensaio de *western-blot*, a fim de se confirmar a presença da proteína.

A microscopia eletrônica de varredura foi feita a partir de 100 mL do homogeneizado, que foi centrifugado a 10000 x g, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi depositado sobre suportes metálicos. As amostras foram cobertas com ouro por 180 segundos, utilizando-se metalizador EMITECH modelo K550 e observadas em microscópio eletrônico de varredura Zeiss modelo DSM 962.

A modelagem da proteína Cry1Ia foi realizada com base na estrutura tridimensional da proteína Cry3A código PDB 1DLC que foi escolhida por se tratar do modelo mais realístico. Com base nesta estrutura o modelo teórico para a proteína Cry1Ia foi construído. Foi feito também o Plot de Ramachandran, para checagem do modelo proposto (<http://raven.bioc.cam.ac.uk/rampage2.php>)

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A amplificação do gene *cry1Ia* a partir da estirpe S1451 gerou um fragmento de 2100pb, correspondentes ao gene em questão. Após a clonagem, o gene foi seqüenciado e a seqüência obtida foi alinhada e analisada gerando uma única seqüência. Foi então feita a análise de BLAST para esta seqüência, que apontou 99% de homologia com a seqüência do gene *cry1Ia* já depositada no GenBank, diferindo somente em três aminoácidos.

Foi construído então, o vetor de recombinação homóloga pSynBtCry1Ia, e este foi co-transfectado com o vírus AcMNPV em células de *T. Ni. 72* após a infecção já era possível observar cerca de 90% das células infectadas com os núcleos repletos de poliedros. O vírus recombinante vAcBtCry1Ia foi então purificado em placas de 96 poços. A confirmação da construção foi feita através de PCR e ensaios de restrição.

O modelo teórico para proteína Cry1Ia foi feito com base na proteína Cry3A, por ter se demonstrado o modelo mais realístico. Após a modelagem foi construído um Plot de Ramachandran que apontou o modelo como sendo favorável.

O vírus purificado foi injetado em larvas de terceiro instar de *S. frugiperda*. Decorridos cinco dias pós a infecção as larvas foram homogeneizadas em água destilada e o extrato foi processado e tratado com inibidores de proteases. Por microscopia óptica, constatou-se a presença de cristais quadrados presentes no extrato celular, fato que, anteriormente não pode ser constatado na cultura de células, indicando que esta proteína necessita de mecanismo de chaperonas para o seu dobramento, mecanismo este, já descrito para outras proteínas Cry. Mostrando que o vírus recombinante poderia estar recrutando algumas destas proteínas durante a infecção no inseto.

A dosagem de proteína foi feita com uso de corante tipo Bradford da Bio Rad (Bradford, 1976). Como havia tanto cristais como poliedros na suspensão, um gel de poliacrilamida foi analisado através do programa Image Phoretix 2D (Pharmacia), que através de cálculos de proporções forneceu os valores da proteína Cry1Ia para 1mL do homogeneizado. A confirmação da expressão da proteína Cry1Ia se deu através de ensaio de "Western-blot" com o anti-soro anti-Cry1Ab, que reconhece



proteínas da família Cry1. A microscopia óptica e eletrônica de varredura confirmou a presença de cristais quadrados no extrato celular das lagartas.

Os ensaios realizados com *Anticarsia gemmatalis* e *Plutella xylostella* não apresentaram resultados significativos, porém, quando realizado bioensaios de dose contra *A. grandis* e *S. frugiperda* os resultados foram muito significativos. O valor de CL_{50} obtido com base nos resultados de três repetições foi de 0,021 mg/mL com intervalo de confiança de 0,017-0,025 mg/ml para o bicudo do algodoeiro e de 0,289 μ g/mL com intervalo de confiança de 0,032-3,310 μ g/mL para *S. frugiperda*. Indicando que este é um gene bastante promissor para a construção de uma nova cultivar de algodão que por sua vez, poderá ser resistente ao *A. grandis* e *S. frugiperda*. Tornando-se um grande avanço biotecnológico no combate a estes insetos-praga.

CONCLUSÃO

Este trabalho permitiu identificar um gene bastante promissor que poderá ser utilizado no controle de *S. frugiperda* e *A. grandis*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

FINNEY, D. **Probit analysis**. Cambridge: Cambridge University Press, 1971. p. 50-80.

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

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

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

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