

**Identificação de proteínas VIP3 em
estirpes de *Bacillus thuringiensis*
tóxicas para lepidópteros-praga**

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

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 222

Identificação de proteínas VIP3 em estirpes de *Bacillus thuringiensis* tóxicas para lepidópteros-praga

Joseilde Oliveira Silva-Werneck

Elias Ferreira Sabiá Júnior

Laíse Silva Evangelista

Thatianny Alves de Lima Silva

Vitor Rios Valdez

Rose Gomes Monnerat

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Brasília, DF
2008

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Serviço de Atendimento ao Cidadão
Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) –
Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 448-4600 Fax: (61) 340-3624
<http://www.cenargen.embrapa.br>
e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Miguel Borges*

Secretária-Executiva: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

Membros: *Diva Maria de Alencar Dusi*
Luiz Adriano Maia Cordeiro
José Roberto de Alencar Moreira
Regina Maria Dechechi G. Carneiro
Samuel Rezende Paiva

Suplentes: *João Batista Tavares da Silva*
Margot Alves Nunes Dode

Supervisor editorial: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

Normalização Bibliográfica: *Rosameres Rocha Galvão*

Editoração eletrônica: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

1ª edição

1ª impressão (2008):

Todos os direitos reservados

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

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

I 19 Identificação de proteínas VIP3 em estirpes de *Bacillus thuringiensis* tóxicas para lepidópteros-praga. / Joseilde Oliveira Silva Werneck ... [et al.]. – Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2008.
- p. - (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ISSN 1676-1340; 222).

1. Lepidóptero. 2. *Bacillus thuringiensis* – controle biológico. I. Silva Werneck, Joseilde Oliveira. II. Série.

632.96 – CDD 21

Sumário

Identificação de proteínas VIP3 em estirpes de *Bacillus thuringiensis* tóxicas para lepidópteros-praga

Joseilde Oliveira Silva-Werneck¹

Elias Ferreira Sabiá Júnior²

Laíse Silva Evangelista³

Thatianny Alves de Lima Silva⁴

Vitor Rios Valdez⁵

Rose Gomes Monnerat⁶

Resumo

A bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt) produz inclusões cristalinas compostas por proteínas denominadas δ -endotoxinas (proteínas Cry e Cyt), durante a fase de esporulação. Essas proteínas são tóxicas e específicas para insetos e outros invertebrados. Algumas estirpes também produzem proteínas inseticidas chamadas Vip (“Vegetative Insecticidal Protein”) durante as fases vegetativa e de esporulação. A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia possui uma Coleção de *Bacillus* spp com aproximadamente 2300 isolados, incluindo *B. thuringiensis* e *B. sphaericus*. As estirpes de Bt nesta coleção são caracterizadas quanto à presença de genes e proteínas Cry e quanto à toxicidade para insetos pertencentes às ordens Lepidoptera, Diptera e Coleoptera. O objetivo deste trabalho foi identificar estirpes de Bt da coleção que produzam proteínas Vip3 e avaliar a atividade destas proteínas contra os lepidópteros *Spodoptera frugiperda* (lagarta do cartucho-do-milho), *Anticarsia gemmatalis* (lagarta da soja) e *Plutella xylostella* (traça das crucíferas), de forma a complementar a caracterização das estirpes. Foram selecionadas 31 estirpes de Bt que mostraram atividade para lepidópteros e realizada busca por genes *vip3* através de PCR, extração de proteínas secretadas, análise das proteínas por SDS-PAGE e bioensaios. Através da prospecção por PCR, genes *vip3* foram detectados em oito estirpes. Os fragmentos de PCR foram seqüenciados e apresentaram elevada identidade de seqüência (mais de 95%) com genes *vip3A* publicados. Análise por SDS-PAGE mostrou a presença de proteínas de aproximadamente 80 kDa, correspondente à massa molecular para Vip3A. As proteínas das oito estirpes positivas não mostraram toxicidade para *A. gemmatalis* e

¹Engenheira Agrônoma – PhD em Biologia Molecular – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

²Biólogo - Graduando - Universidade de Brasília (UnB)

³Bióloga – Graduanda - Universidade de Brasília (UnB)

⁴Bióloga – Graduanda - Universidade de Brasília (UnB)

⁵Biólogo - Graduando - Universidade de Brasília (UnB)

⁶Bióloga – PhD em Entomologia - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

P. xylostella. As proteínas de duas estirpes, S234 e S711, mostraram atividade moderada contra *S. frugiperda*. Estas proteínas serão melhor investigadas visando seu uso no controle de insetos.

Termos para indexação: *Bacillus thuringiensis*, proteínas Vip, lepidópteros, toxicidade, *Spodoptera frugiperda*

IDENTIFICATION OF VIP3 PROTEINS IN *Bacillus thuringiensis* STRAINS TOXIC TO LEPIDOPTERAN PESTS

Abstract

The bacterium *Bacillus thuringiensis* (Bt) synthesizes crystalline inclusions comprised of δ -endotoxin proteins (Cry and Cyt proteins) during the sporulation stage. These proteins are toxic and specific to insects and other invertebrates. Some strains produce also insecticidal proteins called Vip (Vegetative Insecticidal Protein) during the vegetative and sporulation stages. Embrapa Genetic Resources and Biotechnology keeps a Collection of *Bacillus* spp with about 2300 isolates, including *B. thuringiensis* and *B. sphaericus*. The Bt strains in this Collection are characterized regarding the *cry* genes and proteins content, and their toxicity to insects belonging to the Lepidoptera, Diptera and Coleoptera orders. The aim of this work was to identify strains of Bt in the Collection that produce Vip3 proteins and to evaluate the activity of these proteins against the lepidopterans *Spodoptera frugiperda* (fall armyworm), *Anticarsia gemmatalis* (velvet caterpillar) and *Plutella xylostella* (diamondback moth), in order to complement the strains characterization. Thirty one Bt strains which had shown activity against *S. frugiperda* and *A. gemmatalis* were selected. Screening for *vip3* genes through PCR, extraction of secreted proteins, SDS-PAGE analysis of the proteins and bioassays were performed. Through PCR screening, *vip3* were detected in eight strains. The PCR fragments were sequenced and showed high level of identity (more than 95%) with *vip3A* genes published in databases. SDS-PAGE analysis showed proteins around 80 kDa, corresponding to Vip3A molecular mass. The proteins of the eight positive strains did not show toxicity to *A. gemmatalis* and *P. xylostella*. The proteins of two strains, S234 and S711, showed activity against *S. frugiperda*. These proteins will be studied further aiming their use in insect control.

Introdução

Bacillus thuringiensis (Bt) é o agente microbiano mais usado em todo o mundo no controle de insetos-praga agrícolas e vetores de doenças humanas (RANG et al., 2005). As proteínas Cry (δ -endotoxinas) de Bt que se acumulam em forma de cristais nas células durante a esporulação são as principais responsáveis pela toxicidade desta bactéria para insetos e outros invertebrados (SCHNEPF et al., 1998; BRAVO et al., 2007). Além das proteínas Cry e Cyt, algumas estirpes de Bt produzem proteínas inseticidas vegetativas (Vip) durante as fases vegetativas e de esporulação, as quais são secretadas no sobrenadante da cultura. (ESTRUCH et al., 1996; ESTRUCH et al., 1997; BARRETO et al., 1999).

As proteínas Vip não têm homologia de sequência ou estrutura com as toxinas Cry ou Cyt (RANG et al., 2005). Na primeira classe de proteínas Vip, a proteína Vip3A consiste de uma proteína de 88,5 kDa ativa contra um amplo espectro de insetos lepidópteros, incluindo *Agrotis ipsilon*, *Spodoptera exigua*, *Spodoptera frugiperda*, *Heliothis virescens*, e *Helicoverpa zea*, alguns dos quais têm baixa susceptibilidade à maioria das δ -endotoxinas (ESTRUCH et al., 1996; YU et al., 1997). A segunda classe consiste de um sistema binário composto de duas proteínas, Vip1 e Vip2, as quais têm 100 kDa e 52 kDa, respectivamente, e são tóxicas para certas espécies de coleópteros (ESPINASSE et al., 2003). Um sistema de classificação e nomenclatura específico para estas classes de proteínas inseticidas foi proposto e está atualmente em uso (CRICKMORE, 2008).

A proteína Vip3A tem modo de ação semelhante às proteínas Cry (YU et al., 1997). A toxina ativada se liga a células do epitélio do intestino médio de insetos susceptíveis e forma poros na membrana, causando lise celular e subsequente morte do inseto (YU et al., 1997; LEE et al., 2003). Entretanto, estudos demonstraram propriedades distintas de ligação de Vip3A e de Cry1Ac e Cry2Ab2 a receptores de *H. virescens* e *H. zea*, indicando um potencial muito baixo de resistência cruzada entre Vip3A e as proteínas Cry (LEE et al., 2006; JACKSON et al., 2007). Portanto, estas toxinas podem ser usadas em conjunto ou rotação, em estratégias efetivas de controle de pragas e de manejo de resistência (JACKSON et al., 2007). Já existem linhagens de culturas transgênicas de algodão e milho expressando Vip3A, liberadas para testes de campo, desde 2005, nos EUA e Austrália, expressando somente a Vip3A, como as linhagens de algodão COT102 e COT 202 (JACKSON et al., 2007), ou em conjunto com proteínas Cry, como linhagens de algodão e milho expressando Cry1Ab e Vip3A (DIVELY, 2005; O'CALLAGHAN et al., 2005).

No Brasil, pesquisas com toxinas Vip3 estão apenas começando. A Coleção de *Bacillus* Entomopatogênicos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia possui aproximadamente 2300 isolados armazenados. Dentre estes, foram selecionadas 31 estirpes brasileiras de Bt

para serem investigadas quanto à presença de proteínas Vip3. Estas estirpes já haviam sido caracterizadas quanto à presença de genes e proteínas Cry e quanto à patogenicidade. Elas apresentaram elevada toxicidade para a lagarta da soja, *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) e a lagarta do cartucho-do-milho, *S. frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). O presente trabalho visou identificar genes *vip3* nestas estirpes, extrair e caracterizar as proteínas do sobrenadante e avaliar a toxicidade destas proteínas.

Material e métodos

Estirpes e condições de cultivo

As estirpes de *B. thuringiensis* foram isoladas no Laboratório de Bactérias Entomopatogênicas da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e estão armazenadas na Coleção de *Bacillus* spp. desta instituição de pesquisa (MONNERAT et al., 2001). Elas foram selecionadas por sua toxicidade para os lepidópteros *A. gemmatalis* e *S. frugiperda*, verificada através de bioensaios (BATISTA et al., 2005a; BATISTA et al., 2005b). A estirpe-padrão para Vip3A, *B. thuringiensis* subesp. *toworthi* HD-125, foi gentilmente cedida pelo Dr. Fernando Valicente, da Embrapa Milho e Sorgo. A estirpe-padrão para Cry1A e Cry2A, Bt subesp. *kurstaki* (Btk) HD-1, foi recebida da coleção do laboratório do Instituto Pasteur (França). As estirpes foram cultivadas em meio NYSM (YOUSTEN, 1984), a 28°C, com agitação a 200 rpm, ou em placas de LB-ágar (SAMBROOK e RUSSELL, 2001) ou NYSM-ágar a 30 °C, por 15-16 horas.

PCR

O DNA total das estirpes foi extraído por um método rápido descrito por Bravo e colaboradores (BRAVO et al., 1998). Para detecção de genes Vip3, foram usados os oligonucleotídeos Vip3-F (ACATCCTCCCTACACTTTCTAATAC) e Vip3-R (TCTTCTATGGACCCGTTCTCTAC) (ESPINASSE et al., 2003). Foram adicionados 15 µl do sobrenadante obtido na extração à mistura de PCR contendo tampão de *Taq* DNA Polimerase 1x, dNTP mix 0,2 mM, 0,4 µM de cada oligonucleotídeo e 2,5 U de *Taq* DNA Polimerase (Phoneutria), em um volume final de 50 µl. As reações foram realizadas em um termociclador MJ Research, modelo PTC 100, com as seguintes condições gerais: desnaturação inicial a 95°C por 2 min., seguida de 30 ciclos a 95°C por 1 min., 53°C por 1 min., 72°C por 1 min., e extensão final a 72°C por 5 min. Uma amostra de 15 µl de cada produto foi submetida a eletroforese em gel de agarose, o qual foi corado com brometo de etídeo.

Sequenciamento de DNA

Os produtos de PCR com o tamanho esperado para genes *vip3* (678 pb) foram purificados usando o "PureLink PCR purification kit" (Invitrogen). Em seguida, foram sequenciados, usando os dois oligonucleotídeos descritos acima, em sequenciador ABI 3130 XL (Applied

Biosystems). As sequências foram analisadas quanto à qualidade usando o programa Phred (UCB). A sequência consenso para cada gene foi obtida usando-se o programa BioEdit. A identidade da sequência consenso foi analisada através do programa BLAST (NCBI). As sequências consenso foram alinhadas usando o programa ClustalW (KYOTO UNIVERSITY).

Extração de proteínas Vip3

O procedimento de precipitação de proteínas do sobrenadante usado foi baseado no método descrito por Loguercio et al. (2002), com algumas modificações. Para assegurar que as culturas estivessem com número de células e estágio fisiológico semelhante no momento da coleta do sobrenadante, foi usado procedimento de cultivo em duas etapas. Primeiro, foi feito pré-inóculo da estirpe a partir do estoque em glicerol, mantido a -80°C , em 15 ml de caldo nutritivo (NYSM) e incubou-se a 28°C , 200 rpm, por 7-8 h. Em seguida, determinou-se a absorbância a 600 nm (OD_{600}) e inoculou-se o volume requerido para uma OD_{600} inicial de 0,1 em 300 ml de NYSM, em frasco de 1 L. Incubou-se a 28°C , 200 rpm, por 15 h. O processamento do sobrenadante foi feito em etapas, coletando-se três frações para análise, como se segue. Centrifugou-se a cultura com 15 horas (300 ml) em tubos de 50 ml a 16.000 rpm (30.500 x g) (Sorvall, rotor SS34), a 4°C , por 20 min., coletou-se o sobrenadante em um frasco limpo no gelo (sobrenadante). Desta fração, guardou-se uma alíquota de 12 ml, para bioensaios e análise de proteínas, a -20°C . No gelo, precipitou-se o volume restante de sobrenadante com 70% de Sulfato de amônio (Vetec), com agitação e deixou-se durante a noite a 4°C . Centrifugou-se o material precipitado a 16.000 rpm (Sorvall, rotor SS34), 4°C , por 20 min. Deixou-se o pellet secar à temperatura ambiente, por 30 min., ressuspendeu-se em tampão PBS, concentrando-se 12 vezes ($V = 1/12$ do volume precipitado) e transferiu-se para tubo Falcon de 50 ml (precipitado). Guardou-se uma alíquota de 12 ml desta fração para bioensaios e análise de proteínas, a -20°C . Fez-se diálise do volume restante da suspensão em tubo de diálise "Spectra/por membrane tubing", MWCO: 6000 – 8000, Vol/cm: 15,6 ml (Thomas Scientific), a 4°C , em 2 L de dH_2O gelada para cada tubo, por aproximadamente 24 horas, com 4 trocas de água. Coletou-se a suspensão dialisada (dializado) e guardou-se a -20°C até a realização de bioensaios e análise de proteínas.

SDS-PAGE

Proteínas das três frações processadas (sobrenadante, precipitado e dializado) foram separadas por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE-12%), como descrito (LAEMMLI e FAVRE, 1973). Os géis foram corados com prata, usando-se o procedimento que se segue. Lavou-se o gel com etanol 50%, durante 20 min., por três vezes. Descartou-se o etanol e incubou-se em tiosulfato de sódio (20 mg/100 ml) por um min. Descartou-se o tiosulfato de sódio e lavou-se o gel rapidamente com dH_2O , por três vezes. Incubou-se em solução de prata (200 mg de AgNO_3 , 74 μl de formaldeído em 100 ml de dH_2O) durante 20 min., em agitador. Lavou-se o gel rapidamente com dH_2O , por três vezes. Incubou-se em

solução reveladora (6 g de Na₂CO₃, 50 µl de formaldeído, 2 ml de tiosulfato de sódio em 100 ml de dH₂O), com agitação, até detecção das bandas protéicas. A reação foi parada com metanol 45%, ácido acético 10%.

Bioensaios

Os insetos foram mantidos a 26 ± 2°C, 70 ± 10% UR, e fotoperíodo de 14: 10 horas (luz: escuro), em dieta artificial para *A. gemmatalis* ou *S. frugiperda* (MONNERAT et al., 2007), ou natural (folhas de repolho) para *P. xylostella*. Os bioensaios foram realizados conforme previamente descrito (MONNERAT et al, 2007), com as modificações que se seguem. Após solidificação da dieta, foram aplicadas separadamente cada uma das três frações processadas (sobrenadante, precipitado e dialisado). Para *A. gemmatalis* foram distribuídos 150 µl por copo de 50 ml (15,6 µl/cm²) e após secagem, foram adicionadas 10 larvas de 2º estágio. Os copos foram incubados e a avaliação da mortalidade foi feita como descrito (MONNERAT et al, 2007). Foram testadas 10 larvas de *A. gemmatalis* por tratamento, com duas repetições. Para *S. frugiperda* foram distribuídos 35 µl por poço (19,8 µl/cm²) e após secagem, foi adicionada uma larva de 2º estágio por poço em 12 poços de placa de cultura de tecidos de 24 poços. As placas foram incubadas nas mesmas condições de criação dos insetos e a avaliação da mortalidade foi feita no 7º dia. Foram testadas 12 larvas por tratamento, com duas repetições. Para *P. xylostella* foram usados discos de folhas de repolho de 5 cm x 6 cm que foram mergulhados por 10 minutos em suspensão da fração processada diluída 1:10 em dH₂O. Após secagem e transferência do disco para placa de Petri, foram adicionadas 10 larvas de 2º estágio e o bioensaio procedeu como descrito (MONNERAT et al, 2007). Foram testadas 10 larvas de *P. xylostella* por tratamento, com duas repetições. Foram feitos dois controles negativos, tratados com água estéril ou PBS, para cada bioensaio.

Resultados e discussão

PCR

Foi extraído DNA total e realizada PCR de trinta e uma estirpes de Bt que apresentavam toxicidade elevada para *A. gemmatalis* e/ou *S. frugiperda*, além das estirpes-padrão. As estirpes testadas foram: S93, S112, S166, S234, S392, S550, S711, S725, S764, S811, S844, S845, S906, S907, S908, S997, S1269, S1451, S1533, S1537, S1538, S1539, S1540, S1548, S1549, S1551, S1876, S1905, S2003, S2193, S2195 e a estirpe HD-1 de Bt subesp. *kurstaki* (S1450), padrão para proteínas Cry1A. A estirpe HD-125 de Bt subesp. *tolworthi* (S2263) foi usada como controle positivo para o gene *vip3A*. As estirpes-padrão, HD-125 e HD-1, e as estirpes S234, S550, S711, S725, S845, S997, S1905 e S2195 amplificaram produtos de PCR com o tamanho esperado, 678 pb, indicando a presença de gene *vip3* (Fig. 1).

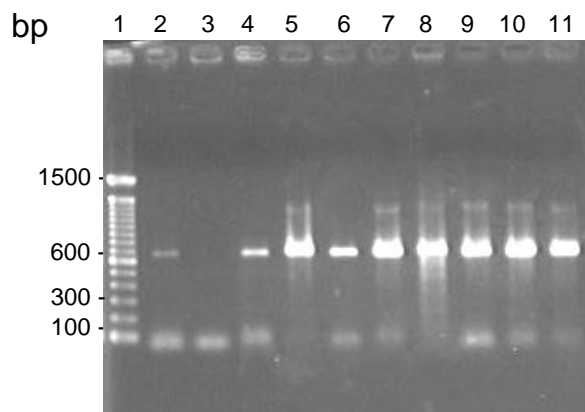


Figura 1. Produtos de PCR para genes *vip3* de estirpes de *B. thuringiensis*. 1 – MM – 100 bp DNA ladder (Invitrogen); 2 – HD-125; 3 – controle negativo (H₂O); 4 – HD-1; 5 – S234; 6 – S550; 7 – S711; 8 – S845; 9 – S997; 10 – S1905; 11 – S725.

Do total de estirpes avaliadas neste trabalho (31), apenas oito (25,8%) possuíam genes *vip3*. Este resultado está próximo ao de outro pesquisador (RICE, 1999) que, fazendo prospecção de *vip3A* em 125 estirpes de uma coleção de Bt, encontrou 29 estirpes positivas (23%). Outro grupo (SPINASSE et al., 2003), em um trabalho de prospecção de toxinas inseticidas secretadas por isolados de Bt analisou 125 isolados quanto à presença de genes para Cry1I, Vip1-2, Vip3 e produção de β -exotoxina I, e identificou genes *vip3* em 52,8% deles. Além disso, o grupo verificou que os 45 sobrenadantes tóxicos para *S. littoralis* possuíam ambos os genes *vip3* e *cry1I*, cujos produtos são ativos contra lepidópteros.

Análise das seqüências

As seqüências dos produtos de PCR das estirpes HD-1, S234, S550, S711, S725, S845, S997 e S1905 foram analisadas por um programa de análise de qualidade do cromatograma, Phred (UCB). As seqüências consenso foram obtidas através do Bioedit e, em seguida, foram alinhadas usando-se o programa ClustalW (KYOTO UNIVERSITY). Parte do alinhamento das seqüências, mostrando conjuntos sombreados em cores para um nível de 80% de similaridade é mostrada na figura 2. Observa-se que, nesta região, S550 apresenta maior grau de similaridade com o padrão HD-125 do que as outras seqüências.

490 500 510 520 530 540

HD125 AAGGATTCCCTATCGGAAGTTA-TTTTATGGTGATATGGATAAAATTAATTGTGCCAGATCA
HD1 AC-TCCGCTTCACTTGATTCTACTTTTTTCTTATTTAAGTCAATTTCTCC-TGTAGAAGA
S234 AC-TCCGCTTCACTTGATTCTACTTTTTTCTTATTTAAGTCAATTTCTCC-TGTAGAAGA
S550 AAGGATTCCCTATCGGAAGTTA-TTTTATGGTGATATGGATAAAATTAATTGTGCCAGATCA
S711 AC-TCCGCTTCACTTGATTCTACTTTTTTCTTATTTAAGTCAATTTCTCC-TGTAGAAGA
S725 AC-TCCGCTTCACTTGATTCTACTTTTTTCTTATTTAAGTCAATTTCTCC-TGTAGAAGA
S845 ACGTCCGCTTCACTTGATTCTACTTTTTTCTTATTTAAGTCAATTTCTCC-TGTAGAAGA
S997 AC-TCCGCTTCACTTGATTCTACTTTTTTCTTATTTAAGTCAATTTCTCC-TGTAGAAGA
S1905 AC-TCCGCTTCACTTGATTCTACTTTTTTCTTATTTAAGTCAATTTCTCC-TGTAGAAGA

550 560 570 580 590 600

HD125 ATCTGAACAAAATCTATTATACAAATAACATAGTATTTCCAAAATGAATATGTAATTACTAA
HD1 ATCATAA-AAAATTCGCTGTT-----ACCTCATATCATAAAGTTTTCATTTTTTTTAGGGA
S234 ATCATAA-AAAATTCGCTGTT-----ACCTCATATCATAAAGTTTTCATTTTTTTTAGTAA
S550 ATCTGAACAAAATCTATTATACAAATAACATAGTATTTCCAAAATGAATATGTAATTACTAA
S711 ATCATAA-AAAATTCGCTGTT-----ACCTCATATCATAAAGTTTTCATTTTTTTTAGTAA
S725 ATCATAA-AAAATTCGCTGTT-----ACCTCATATCATAAAGTTTTCATTTTTTTTAGTAA
S845 ATCATAA-AAAATTCGCTGTT-----ACCTCATATCATAAAGTTTTCATTTTTTTTAGTGA
S997 ATCATAA-AAAATTCGCTGTT-----ACCTCATATCATAAAGTTTTCATTTTTTTTAGTGA
S1905 ATCATAA-AAAATTCGCTGTT-----ACCTCATATCATAAAGTTTTCATTTTTTTTAGTGA

610 620 630 640 650 660

HD125 AATTCATTTTACTAAAAAATGAAAACCTTTAAGATATGAGGTA-----ACAGCGAATTTT
HD1 AATCAATTTTACTAAATTAATACTCATTTGGAAATACATATGTTATTTTGTATAATAGATT
S234 AATCAATTTTACTAAATTAATACTCATTTGGAAATACATATATATTTTGTATAATATATTT
S550 AATTCATTTTACTAAAAAATGAAAACCTTTAAGATATGAGGTA-----ACAGCGAATTTT
S711 AATCAATTTTACTAAATTAATACTCATTTGGAAATACATATATATTTTGTATAATATATTT
S725 AATCAATTTTACTAAATTAATACTCATTTGGAAATACATATATATTTTGTATAATATATTT
S845 AATCAATTTTACTAAATTAATACTCATTTGGAAATACATATGTTATTTTGTATAATAGATT
S997 AATCAATTTTACTAAATTAATACTCATTTGGAAATACATATGTTATTTTGTATAATAGATT
S1905 AATCAATTTTACTAAATTAATACTCATTTGGAAATACATATGTTATTTTGTATAATAGATT

670 680 690 700 710 720

HD125 -TTATGATTCTTCTACA-GGAGAAATTGACTTAAATA--AGAAAAAGTAGAATCAAGT
HD1 GTTCAGATTGATCTGGGCACAATAAATTTATCCATATC--ACACATAAATAACTTCCGAT
S234 GTTCAGATTGATCCGGGCACAATAAATTTATCCATATC--ACCAT-AAACAACCTTCCGAT
S550 -TTATGATTCTTCTACA-GGAGAAATTGACTTAAATA--AGAAAAAGTAGAATCAAGT
S711 GTTCAGATTGATCCGGGCACAATAAATTTATCCATATC--ACCAT-AAACAACCTTCCGAT
S725 GTTCAGATTGATCCGGGCACAATAAATTTATCCATATC--ACCAT-AAACAACCTTCCGAT
S845 GTTCAGATTGATCTGGGCACAATAAATTTATCCATATC--ACCAT-AAACAACCTTCCGAT
S997 GTTCAGATTGATCTGGGCACAATAAATTTATCCATATC--ACCAT-AAATAACTTCCGAT
S1905 GTTCAGATTGATCTGGGCACAATAAATTTATCCATATC--ACCAT-AAATAACTTCCGAT

730 740 750 760 770 780

HD125 GAACCGGAGTATAGAACGTTA-AGTGCATAATGATGATGGAGTGTATATGCCGTTAGGTTGT
HD1 AAGGAATCCCTTATCGACTTGATAAATTTTGTTTTAGCTTAGCCTCATATACTTTTAA-TAC
S234 AAGGAATCCCTTATTAACCTTGATAAATTTTGTTTTAGCTTAGCCTCATATACTTTTAA-TAC
S550 GAACCGGAGTATAGAACGTTA-AGTGCATAATGATGATGGGGTGTATAAGCCGTTAGGTTGT
S711 AAGGAATCCCTTATTAACCTTGATAAATTTTGTTTTAGCTTAGCCTCATATACTTTTAA-TAC
S725 AAGGAATCCCTTATTAACCTTGATAAATTTTGTTTTAGCTTAGCCTCATATACTTTTAA-TAC
S845 AAGGAATCCCTTATCGACTTGATAAATTTTGTTTTAGCTTAGCCTCATATACTTTTAA-TAC
S997 AAGGAATCCCTTATCGACTTGATAAATTTTGTTTTAGCTTAGCCTCATATACTTTTAA-TAC
S1905 AAGGAATCCCTTATCGACTTGATAAATTTTGTTTTAGCTTAGCCTCATATACTTTTAA-TAC

790 800 810 820 830 840

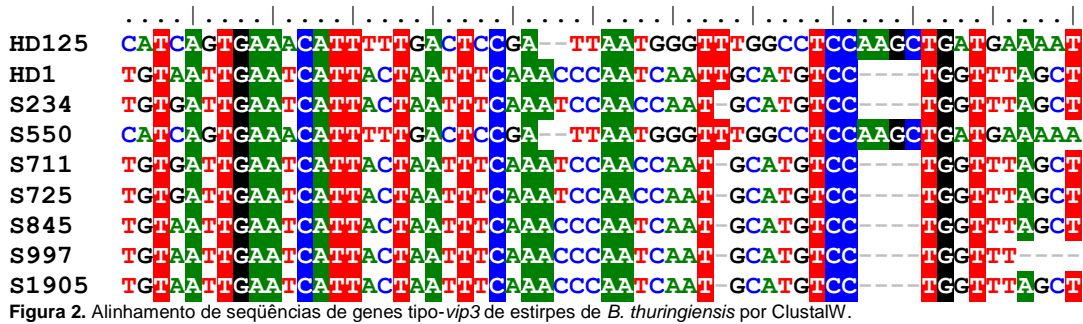


Figura 2. Alinhamento de seqüências de genes tipo-*vip3* de estirpes de *B. thuringiensis* por ClustalW.

ClustalW também permitiu a construção de uma árvore filogenética (Fig. 3) a partir da similaridade das seqüências alinhadas. Análise deste dendrograma revelou maior proximidade filogenética entre as estirpes S234 e S725, que se encontram distantes de HD-125. Por outro lado, HD-125 está mais próximo filogeneticamente de S550 (Fig. 3).

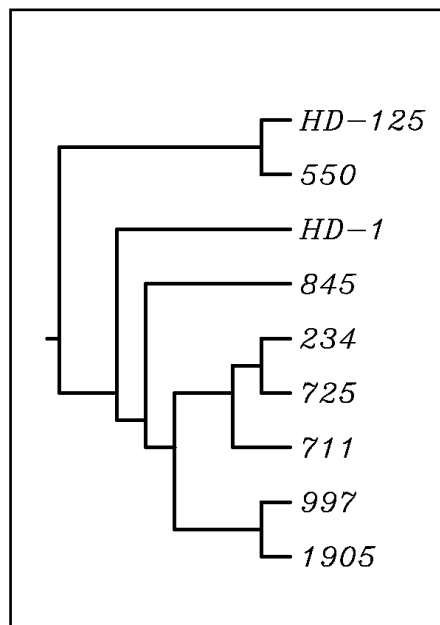


Figura 3. Árvore filogenética das seqüências de genes *vip3* de estirpes de *B. thuringiensis*. As distâncias foram obtidas após alinhamento das seqüências através do programa ClustalW.

Foi realizada busca por identidade das seqüências nos bancos de dados, através do programa BLAST. Observou-se elevado nível de identidade das seqüências consenso com seqüências de genes *vip3* depositadas no GeneBank. A identidade mais elevada foi observada para o gene da estirpe S997, que apresentou 100% de identidade com genes *vip3* de diversas estirpes de Bt, incluindo o gene *vip3Aa1* (acesso n. L48811) da estirpe AB88 (ESTRUCH et al., 1996), e de Bt serovar *aizawai*. As seqüências de S550 e S845 apresentaram 99% de identidade com genes de diversas estirpes, incluindo AB88 e serovar *aizawai*. A seqüência de S550 também mostrou 98% de identidade com o gene *vip3Aa8* do padrão HD-125 (acesso n. AF399667.1). A seqüência de S1905 mostrou 98% de identidade com *vip3Aa1* e outros. Em seguida, a seqüência de S234, com 97% de identidade com genes de várias estirpes, incluindo AB88 e

HD-125, S711 com 96% de identidade com estas e outras estirpes e S725 com 95% de identidade com as mesmas estirpes. A sequência obtida para a estirpe HD-1 apresentou 96% de identidade com genes de várias estirpes, inclusive *vip3Aa1* de AB88, e 95% com *vip3Aa8* de HD-125.

Perfil protéico

A análise das frações processadas do sobrenadante das estirpes em SDS-PAGE-12%, após coloração com prata, mostrou a existência de diferentes perfis e concentrações protéicas. As maiores concentrações foram observadas para a fração precipitada e concentrada 12 vezes. Bandas de massa molecular próxima à esperada para proteínas Vip3A, de aproximadamente 88 kDa (ESTRUCH et al., 1996; LOGUERCIO et al., 2002) foram observadas em HD-125 e em algumas estirpes. As figuras 4 e 5 mostram o perfil protéico das estirpes HD-125, S234 e S845 (Fig. 4), S997 e S711 (Fig. 5).

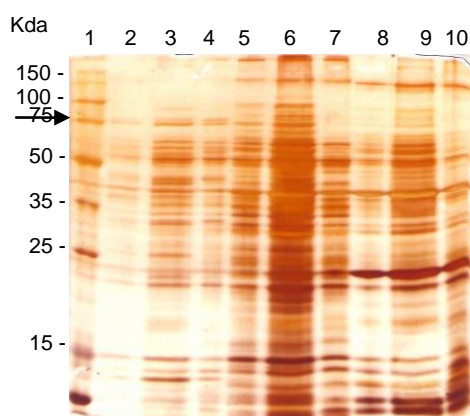


Figura 4. SDS-PAGE-12% de frações do sobrenadante de estirpes de *B. thuringiensis*. 1 - Marcador de MM ("Broad range molecular weight markers" - Promega) – 3 µl; 2 a 4 – frações de HD-125; 5 a 7 – frações de S234; 8 a 10 – frações de S845. Poços 2, 5 e 8 – sobrenadante; 3, 6 e 9 – precipitado; 4, 7 e 10 – dialisado. Foram aplicados 22,5 µl de amostra por poço. A seta mostra a posição das proteínas Vip3.

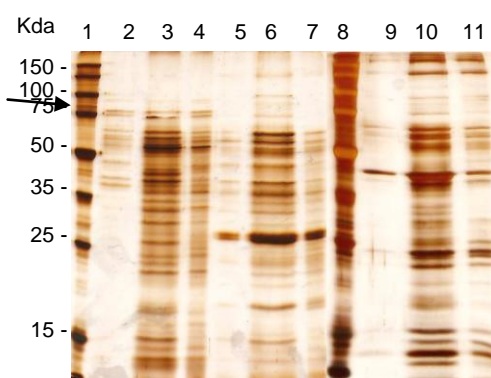


Figura 5. SDS-PAGE-12% de frações do sobrenadante de estirpes de *B. thuringiensis*. 1 e 8 - Marcador de MM ("Broad range molecular weight markers" - Promega); 2 a 4 – frações de HD-125; 5 a 7 – frações de S997; 9 a 11 – frações de S711. Poços 2, 5 e 9 – sobrenadante; 3, 6 e 10 – precipitado; 4, 7 e 11 – dialisado. Foram aplicados 22,5 µl de amostra por poço. A seta mostra a posição das proteínas Vip3.

Observou-se um baixo rendimento de proteínas nesta faixa de tamanho, sendo que a maior concentração, de acordo com a análise de SDS-PAGE, foi obtida nas frações precipitadas por Sulfato de amônio. O baixo rendimento pode ser devido tanto à metodologia de precipitação, quanto ao tempo de crescimento das culturas (15 h). Milne et al. (2008) desenvolveram um protocolo para obtenção de altos rendimentos de proteína Vip3A altamente purificada. O protocolo baseia-se em precipitação com acetona de proteínas do sobrenadante (a partir de 1100 ml), seguido de fracionamento em HPLC e vários passos de concentração. A recuperação chegou a próximo de 100%. Segundo estes autores, culturas com 18-20 h foram melhores para purificação de Vip3Aa do que culturas mais jovens, que não tinham produzido suficiente Vip3Aa, e do que culturas mais velhas que continham contaminantes que interferiam com o protocolo (MILNE et al., 2008).

Bioensaios

As frações processadas das estirpes S234, S550, S711, S725, S845, S997, S1905, HD-1 e HD-125 foram testadas através de bioensaios seletivos contra *P. xylostella*, *A. gemmatalis* e *S. frugiperda*. Para *P. xylostella*, em geral, as frações protéicas apresentaram taxas muito baixas ou nulas de mortalidade (0-29,2%). As melhores porcentagens de mortalidade foram obtidas com a estirpe S725 (25% para o sobrenadante, 29,2% para o precipitado e 20,8% para o dialisado). Para *A. gemmatalis*, as porcentagens de mortalidade também foram muito baixas (0-20,8%), sendo as melhores taxas também para S725 (4,2% para o sobrenadante, 20,8% para o precipitado e 20,8% para o dialisado). Para *S. frugiperda*, as porcentagens de mortalidade foram baixas a moderadas. Entre as melhores estirpes, S725 mostrou 12,5% de mortalidade para o sobrenadante, 29,2% para o precipitado e 33% para o dialisado, e S845 mostrou 29,2% de mortalidade para as três frações. As estirpes S234 e S711 apresentaram as melhores mortalidades para *S. frugiperda*, sendo que os bioensaios foram repetidos 3 vezes com frações protéicas recém preparadas, resultando numa média de 48,5% de mortalidade para o precipitado de S711 e 45,8% para o dialisado de S234 (Tabela 1). Estas estirpes mostraram melhor nível de mortalidade do que o padrão para Vip3, HD-125, e a estirpe HD-1 de Btk. A tabela 1 mostra a média da porcentagem de mortalidade de três bioensaios, com 2 repetições cada, para S234 e S711, e de dois bioensaios, com duas repetições cada, para HD-1 e HD-125. A mortalidade de *S. frugiperda* causada pela fração precipitada e concentrada 12 vezes de HD-125 (20,8%) foi menor do que a relatada de 38,1% (LOGUERCIO et al., 2002), para a fração precipitada e concentrada por procedimento semelhante.

Tabela 1. Atividade inseticida (% de mortalidade) de frações processadas do sobrenadante de estirpes de *B. thuringiensis* contra larvas de 2º estágio de *S. frugiperda*.

Estirpe	Fração do processamento	% mortalidade*
S234	Sobrenadante	15,3
	Precipitado	41,6
	Dialisado	45,8
S711	Sobrenadante	18,0
	Precipitado	48,5
	Dialisado	13,8
HD-125	Sobrenadante	20,8
	Precipitado	20,8
	Dialisado	16,6
HD-1	Sobrenadante	20,8
	Precipitado	25,0
	Dialisado	14,6

* Médias de mortalidade de 3 bioensaios com S234 e S711 e de 2 bioensaios com HD-125 e HD-1.

Loguercio et al. (2002) consideraram o nível de 38,1% de mortalidade como moderadamente tóxico para *S. frugiperda*, tendo em vista que os bioensaios foram feitos com extratos de sobrenadantes contendo Vip3A. Segundo estes autores, a eficiência é muito aumentada quando a proteína Vip3A é expressa em *Escherichia coli* e a bactéria recombinante é usada em bioensaios, chegando a 100% de mortalidade de *S. frugiperda* (ESTRUCH et al., 1996; LOGUERCIO et al., 2002). Além de *S. frugiperda*, as primeiras proteínas desta classe relatadas (Vip3Aa e Vip3Ab), quando expressas em *E. coli*, exibiram elevado índice de mortalidade (100%) também para *A. ipsilon* (lagarta rosca) e *S. exigua* (lagarta militar). Milne et al (2008) mostraram que os lepidópteros *Choristoneura fumiferana* e *Lymantria dispar* são menos suscetíveis a Vip3Aa do que *S. exigua* (10 e ~ 100 vezes, respectivamente). Para estas espécies, a diferença na suscetibilidade foi mostrada por bioensaios usando inibição de crescimento como resposta à dose, e não mortalidade. Estes autores consideram como altamente suscetíveis a Vip3Aa as espécies *S. exigua* e *A. ipsilon*, e menos suscetíveis as espécies *Trichoplusia ni*, *H. virescens*, *C. fumiferana* e *L. dispar*. Em um outro trabalho (RANG et al., 2005), a nova proteína Vip3Ba1 foi expressa em estirpe de *E. coli* recombinante e não causou mortalidade em *O. nubilalis* e *P. xylostella*, apenas redução de crescimento das larvas, impedindo a mudança de instar.

Conclusões

Foram detectados genes *vip3* em estirpes brasileiras de Bt que mostram elevada identidade com as seqüências de genes *vip3* depositadas nos bancos de dados. Alguns dos genes mostram diferenças nas seqüências e codificam proteínas secretadas no sobrenadante e com

atividade contra *S. frugiperda*. Estes genes devem ser clonados, expressos em *E. coli* e a atividade da proteína purificada deve ser avaliada contra *S. frugiperda*.

Agradecimentos

Ao CNPq pelo financiamento do projeto e pela concessão de bolsa de iniciação científica através do programa PIBIC.

Referências bibliográficas

BARRETO, M. R.; LOGUERCIO, L. L.; VALICENTE, F. H.; PAIVA, E. Insecticidal activity of culture supernatants from *Bacillus thuringiensis* Berliner strains against *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, SP, v. 28, n. 4, p. 675-685, 1999.

BATISTA, A. C.; MELATTI, V. M.; DEMO, C.; MARTINS, E. S.; PRAÇA, L. B.; GOMES, A. C. M. M.; FALCÃO, R.; BROD, C. S.; MONNERAT, R. G. **Prospecção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas para o controle de *Anticarsia gemmatilis***. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005b. 19p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 82).

BATISTA, A.; MELATTI, V.; DEMO, C.; MARTINS, E.; PRAÇA, L.; GOMES, A. C. M. M.; FALCÃO, R.; BROD, C.; MONNERAT, R. G. **Prospecção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* tóxicas a *Spodoptera frugiperda***. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005a. 19 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 81).

BRAVO, A.; GILL, S. S. ; SOBERON, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, Elmsford, US, v. 49, n. 4, p. 423-435, 2007.

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.; QUINTERO, R. Characterization of *cry* genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, US, v. 64, p. 4965-4972, 1998.

CRICKMORE, N. *Bacillus thuringiensis*: toxin nomenclature. Disponível em: < http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/ >. Acesso em: 20 out. 2008.

DIVELY, G. P. Impact of transgenic VIP3A x Cry1Ab lepidopteran-resistant field corn on the nontarget arthropod community. **Environmental Entomology**, College Park, US, v. 34, n. 5, p. 1267-1291, 2005.

ESPINASSE, S.; CHAUFAUX, J.; BUISSON, C.; PERCHAT, S.; GOHAR, M.; BOURGUET, D.; SANCHIS, V. Occurrence and linkage between secreted insecticidal toxins in natural isolates of *Bacillus thuringiensis*. **Current Microbiology**, New York, US, v. 47, p. 501-507, 2003.

ESTRUCH, J. J.; CAROZZI, N. B.; DESAI, N.; DUCK, N. B.; WARREN, G. W.; KOZIEL, M. G. Transgenic plants: an emerging approach to pest control. **Nature Biotechnology**, New York, US, v. 15, n. 2, p.137-141, 1997.

ESTRUCH, J. J.; WARREN, G. W.; MULLINS, M. A.; NYE, G. J.; CRAIG, J. A.; KOZIEL, M. G. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v. 93, n. 11, p. 5389-5394, 1996.

JACKSON, R. E.; MARCUS, M. A.; GOULD, F.; BRADLEY JUNIOR, J. R.; VAN DUYN, J. W. Cross-resistance responses of crylac-selected *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) to the *Bacillus thuringiensis* protein vip3A. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, US, v. 100, n. 1, p. 180-186, 2007.

KYOTO UNIVERSITY. Multiple sequence alignment by CLUSTALW. Disponível em: <<http://align.genome.jp/>>. Acesso em: 14 nov. 2008.

LAEMMLI, U. K.; FAVRE, M. Maturation of the head of bacteriophage T4. **Journal of Molecular Biology**, London, GB, v. 80, p. 575-599, 1973.

LEE, M. K.; MILES, P.; CHEN, J. S. Brush border membrane binding properties of *Bacillus thuringiensis* Vip3A toxin to *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* midguts. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, Amsterdam, Netherlands, v. 339, n. 4, p. 1043-1047, 2006.

LEE, M. K.; WALTERS, F. S.; HART, H.; PALEKAR, N.; CHEN, J. S. The mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A differs from that of Cry1Ab delta-endotoxin. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, US, v. 69, n. 8, p. 4648-4657, 2003.

LOGUERCIO, L. L.; BARRETO, M. L.; ROCHA, T. L.; SANTOS, C. G.; TEIXEIRA, F. F.; PAIVA, E. Combined analysis of supernatant-based feeding bioassays and PCR as a first-tier screening strategy for Vip-derived activities in *Bacillus thuringiensis* strains effective against tropical fall armyworm. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, GB, v. 93, n. 2, p. 269-277, 2002.

MILNE, R.; LIU, Y.; GAUTHIER, D.; VAN FRANKENHUYZEN, K. Purification of Vip3Aa from *Bacillus thuringiensis* HD-1 and its contribution to toxicity of HD-1 to spruce budworm (*Choristoneura fumiferana*) and gypsy moth (*Lymantria dispar*) (Lepidoptera). **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, US, v. 99, n. 2, p. 166-172, 2008.

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

MONNERAT, R. G.; SILVA, S. F. da; SILVA WERNECK, J. O. **Catálogo do banco de germoplasma de bactérias entomopatogênicas do gênero *Bacillus***. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. p. 65. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 60)

NCBI. Basic local alignment search tool. Disponível em: <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>. Acesso em: 17 nov. 2008.

O'CALLAGHAN, M.; GLARE, T. R.; BURGESS, E. P. J.; MALONE, L. A. Effects of plants genetically modified for insect resistance on nontarget organisms. **Annual Review of Entomology**, Stanford, US, v. 50, p. 271-292, 2005.

RANG, C.; GIL, P.; NEISNER, N.; VAN RIE, J.; FRUTOS, R. Novel Vip3-related protein from *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, US, v. 71, n. 10, p. 6276-6281, 2005.

RICE, W. C. Specific primers for the detection of vip3A insecticidal gene within a *Bacillus thuringiensis* collection. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, GB, v. 28, p. 378-382, 1999.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor, 2001.

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

UCB. Bioinformatics Laboratory services. Disponível em:
<<http://www.bioinformatica.ucb.br/electro.html>>. Acesso em: 07 mar. 2008.

YOUSTEN, A. A. *Bacillus sphaericus*: microbiological factors related to its potential as a mosquito larvicide. **Advances in Biotechnology Processes**, [S.l.], v. 3, p. 315-343, 1984.

YU, C. G.; MULLINS, M. A.; WARREIN, G. W.; KOZIEL, M. G.; ESTRUCH, J. J. The *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein VIP3A lyses midgut epithelium cells of susceptible insects. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, US, v. 63, n. 2, p. 532-536, 1997.