

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL – UFRGS
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

Clonagem e expressão de um gene da família *Cry1A* de
Bacillus thuringiensis em *Escherichia coli*

Barbara Bez Barzan

Trabalho apresentado como conclusão de curso para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, ênfase Molecular, Celular e Funcional.

Orientadora: Prof. Dra. Luciane Maria Pereira Passaglia

Co-orientador: Me. Rafael Rodrigues de Oliveira

Porto Alegre

2010

Esse trabalho foi realizado no Departamento de Genética do Instituto de Biociências da UFRGS, com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Pró-Reitoria de Pesquisa da UFRGS e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

Agradecimentos

À minha orientadora, Dra. Luciane Passaglia, pelos ensinamentos, pela amizade e pela ajuda nos momentos complicados.

Ao Me. Rafael Rodrigues de Oliveira, que, além de um excelente co-orientador, é um ótimo amigo, sempre disposto a aprender dicas de gastronomia, me incentivando quando parecia que tudo estava errado.

Ao pessoal do laboratório, em especial aos outros Rafas, o Rauber e o Japa. Muito obrigada pela ajuda com o TCC, pelos chocolates e pelo café!

Aos meus pais, pelo amor e apoio incondicionais!

Ao meu irmão por toda a nossa história.

Ao Felipe pela paciência, pelo companheirismo e por todo carinho.

À Cissa pela amizade, as risadas e a revisão do meu texto.

Aos amigos que a graduação me trouxe, que ajudaram, e muito, para que esses quatro anos fossem inesquecíveis.

Aos meus amigos de Caxias, que nunca deixaram a distância ser um problema.

A todos que contribuíram para a realização desse trabalho.

Clonagem e expressão de um gene da família *Cry1A* de *Bacillus thuringiensis* em *Escherichia coli*

Autora: Barbara Bez Barzan

Orientadora: Prof. Dra. Luciane Maria Pereira Passaglia

RESUMO

Bacillus thuringiensis é uma bactéria Gram-positiva, entomopatogênica, aeróbia e amplamente utilizada como biopesticida para controle de insetos-praga de culturas importantes. Estas bactérias são encontradas normalmente no solo, na superfície de folhas e também como patógenos de muitos insetos. Elas são capazes de se manter em latência, sob forma de endósporos, em condições adversas. Durante a fase de esporulação, as bactérias sintetizam proteínas que se acumulam na periferia dos esporos sob forma de cristais. Estes cristais são compostos por aglomerados de proteínas Cry inativas, sob a forma de protoxinas de 130 kDa, também chamadas de delta-endotoxinas. As proteínas Cry são tóxicas para membros da classe Insecta, bem como para outros invertebrados, como membros do filo Nematoda. Esse trabalho teve como objetivos a clonagem e a expressão de um gene pertencente à família *Cry1A* da linhagem UNI498 de *Bacillus thuringiensis*, isolada do solo do Rio Grande do Sul. Um fragmento de aproximadamente 1900 pb, correspondendo às regiões amino e central da proteína Cry, foi amplificado por PCR usando iniciadores especificamente projetados. Este fragmento foi clonado em pGEM® T-Easy e quase totalmente sequenciado. A sequência de nucleotídeos obtida, bem como a de aminoácidos, foi comparada com sequências de genes e proteínas da família *Cry1A* disponíveis no GenBank. Uma alta identidade foi observada entre as sequências do fragmento amplificado e sequências pertencentes à subfamília *Cry1Aa*. Análises filogenéticas corroboraram a classificação do gene isolado da linhagem *Bt* UNI498 como pertencente a essa subfamília. Tentativas de expressar a proteína *Cry1Aa* isolada em *E. coli* foram realizadas utilizando-se os vetores de expressão pGEX e pET23a, sem resultados positivos. Novas clonagens estão em andamento a fim de se obter um extrato protéico de *E. coli* com a nova proteína *Cry1Aa*, para posteriores bioensaios de toxicidade em lagartas de *Anticarsia gemmatilis*.

Cloning and expression of *Bacillus thuringiensis* *Cry1A* gene family member in *Escherichia coli*

Author: Barbara Bez Barzan

Adviser: Prof. Dra. Luciane Maria Pereira Passaglia

ABSTRACT

Bacillus thuringiensis is a Gram-positive entomopathogenic aerobic bacterium widely used as biopesticide to control plague insects of important crops. These bacteria are usually found in soil, leaf surface and also as pathogens to several insects. They are able to present a latent endospore form under adverse conditions. During the sporulated phase, the bacteria synthesize proteins that accumulate in cell periphery as crystals. These crystals are composed of inactive Cry proteins in the form of 130 kDa protoxins, also known as delta-endotoxins. Cry proteins are specifically toxic for some insects and nematodes. This work aimed the cloning and expression of a *Bacillus thuringiensis* strain UNI498 *Cry1A* gene family member, which was isolated from soils of Rio Grande do Sul state. A fragment of approximately 1900 bp, corresponding to the amino and central regions of the Cry protein, was PCR amplified using specifically designed initiators. This fragment was cloned into pGEM® T-Easy vector and almost completely sequenced. The nucleotide and amino acid sequences obtained were compared to *Cry1A* gene family sequences available at GenBank database. A high identity between the amplified fragment sequences and the *Cry1Aa* subfamily sequences was observed. Phylogenetic analyses corroborated the classification of the isolated gene from *Bt* UNI498 as belonging to the *Cry1Aa* subfamily. Expression of the isolated *Cry1Aa* protein in *Escherichia coli* using pGEX or pET23a expression vectors was unsuccessful. New cloning attempts are underway to obtain an *E. coli* protein extract containing the new *Cry1Aa* protein to be further used in toxicity assays against *Anticarsia gemmatalis* larvae.

Sumário

1. Introdução	8
1.1. <i>Bacillus thuringiensis</i>	8
1.2. Proteínas Cry.....	8
1.3. Modos de ação	10
1.3.1. Modelo da formação de poros	10
1.3.2. Modelo de transdução de sinal.....	11
1.4. A produção de soja e o impacto da lagarta de <i>Anticarsia gemmatalis</i>	12
1.5. Uso de bioinseticidas	12
1.6. Plantas transgênicas expressando a proteína Cry.....	13
1.7. Caracterização de isolados de <i>Bt</i> do Estado do Rio Grande do Sul.....	14
1.8. Objetivos	15
2. Material e métodos	16
2.1. Linhagem bacteriana.....	16
2.2. Cultivo e extração de plasmídeos	16
2.2.1. DNA plasmidial	16
2.3. Oligonucleotídeos e reação em cadeia da polimerase (PCR)	16
2.3.1. Modelagem dos oligonucleotídeos reverso e direto.....	16
2.3.2. Condições de amplificação do fragmento correspondente às regiões amino terminal e central da proteína Cry do DNA da linhagem UNI498 de <i>Bacillus thuringiensis</i>	18
2.4. Clonagem em vetores plasmidiais	19
2.4.1. Clonagem e sequenciamento do fragmento correspondente às regiões amino terminal e central da proteína Cry em vetor plasmidial pGEM® T-Easy (Promega)	19
2.4.2. Clonagem e sequenciamento do fragmento correspondente às regiões amino terminal e central da proteína Cry em vetor pENTR™/D-TOPO® (Invitrogen).....	19
2.4.3. Clonagem e expressão do fragmento correspondente às regiões amino terminal e central da proteína Cry nos vetores de expressão pGEX® 4T3 e pET-23a(+) [®]	20
2.5. Análise das sequências obtidas por ferramentas de bioinformática	20
2.6. Indução da expressão de proteínas.....	21
2.6.1. Indução da expressão de proteínas em bactérias <i>E. coli</i> BL21(DE3) Ril eletrocompetentes	21

2.6.2. Análise da expressão de proteínas em gel de poliacrilamida.....	21
3. Resultados e discussão	23
3.1. Modelagem dos oligonucleotídeos reverso e direto.....	23
3.2. Amplificação do fragmento correspondente às regiões amino terminal e central da proteína Cry do DNA da linhagem UNI498 de <i>Bacillus thuringiensis</i>	23
3.3. Clonagem e sequenciamento do fragmento correspondente às regiões amino terminal e central da proteína Cry em vetor plasmidial pGEM® T-Easy (Promega).....	24
3.4. Clonagem e sequenciamento do fragmento correspondente às regiões amino terminal e central da proteína Cry em vetor pENTR™/D-TOPO® (Invitrogen)	25
3.5. Análise das sequências obtidas por ferramentas de bioinformática	26
3.6. Clonagem e expressão do fragmento correspondente às regiões amino terminal e central da proteína Cry nos vetores de expressão pGEX® 4T3 e pET-23a(+)®.....	30
4. Perspectivas	33
5. Referências bibliográficas	34
5.1. Fontes da internet.....	39
6. Apêndice	40

1. Introdução

1.1. *Bacillus thuringiensis*

A bactéria *Bacillus thuringiensis* foi isolada em 1911, em Thuringen, na Alemanha, a partir de mariposa-do-solo (*Epehstia kuhniella*). Berliner nomeou essa nova bactéria de *Bacillus thuringiensis* (Berliner, 1915).

Bacillus thuringiensis é membro da mesma família de *Bacillus cereus*, que contém, além de *B. thuringiensis* e *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides* e *B. weihenstephanensis* (Rasko *et al*, 2005). *B. thuringiensis* difere bem pouco, geneticamente, de *B. cereus* e *B. anthracis*. A principal diferença está nos plasmídeos que cada espécie porta: *B. thuringiensis* possui plasmídeos codificadores de proteínas inseticidas Cry, enquanto *B. cereus* possui plasmídeos codificadores de enterotoxinas causadoras de infecção alimentar e *B. anthracis* apresenta plasmídeos que portam genes codificadores dos fatores de virulência causadores do anthrax (Radnedge *et al*, 2003).

Bacillus thuringiensis (*Bt*) é uma bactéria Gram-positiva, entomopatogênica, aeróbia, amplamente utilizada como biopesticida para controle de insetos-praga de culturas importantes. Estas bactérias são encontradas normalmente no solo, na superfície de folhas e também como patógenos de muitos insetos (Carozzi *et al*, 1991). Elas são capazes de se manter em latência, sob forma de endósporos, em condições adversas. Durante a fase de esporulação, as bactérias sintetizam proteínas que se acumulam na periferia dos esporos sob forma de cristais (Peferöen, 1997). Estes cristais são compostos por aglomerados de proteínas Cry inativas, sob a forma de protoxinas de 130 kDa, também chamadas de delta-endotoxinas (Knowles *et al*, 1993). As proteínas Cry são tóxicas para membros da classe Insecta (Schnepf *et al*, 1998), bem como para outros invertebrados, como membros do filo Nematoda (Marroquin *et al*, 2000).

1.2. Proteínas Cry

As proteínas Cry se dividem em 54 famílias. Cada uma destas famílias pode ser composta por inúmeras subfamílias, apresentando, atualmente, mais de 200 membros no total. O principal grupo das proteínas Cry, que inclui os tipos de maior toxicidade a diferentes espécies, é chamado de família dos três domínios (Guo *et al*, 2009). Os membros desta

família compartilham três domínios fundamentais: I, II e III. Estes domínios correspondem à porção ativa da proteína, ou seja, à sequência polipeptídica liberada após a clivagem da proteína precursora (protoxina) pelas proteases intestinais dos insetos suscetíveis (de Maagd *et al.*, 2001).

As estruturas terciárias de diversas toxinas Cry com especificidade a diferentes insetos foram resolvidas, incluindo Cry1Aa, Cry2Aa, Cry3Aa, Cry3Ba, Cry4Aa e Cry4Ba. As estruturas revelaram que existe alta similaridade entre os três domínios, sugerindo que o mecanismo de ação da proteína segue conservado (Li *et al.*, 1991; Grochulski *et al.*, 1995; Morse *et al.*, 2001; Galitsky *et al.*, 2001; Boonserm *et al.*, 2005, 2006).

O domínio I é formado por sete α -hélices e está envolvido na inserção na membrana e na formação de poros. (Bravo *et al.*, 2007). O domínio II é uma β -folha, formada por duas folhas antiparalelas, e o domínio III é um β -sanduíche, conforme demonstrado na Figura 1. Os domínios II e III estão envolvidos no reconhecimento e interação com receptores no intestino médio do inseto (Li *et al.*, 1991; Boonserm *et al.*, 2005; Bravo *et al.*, 2005).

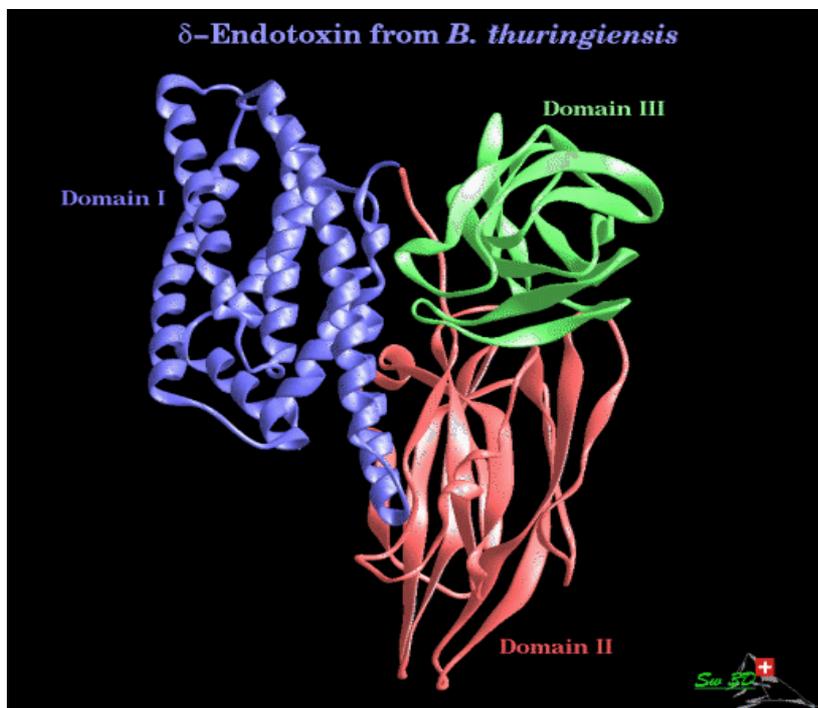


Figura 1: Representação da estrutura terciária da proteína Cry. Fonte: Carroll e colaboradores (1991).

1.3. Modos de ação

Dois modelos têm sido propostos para descrever o modo de ação das proteínas Cry. Durante pelo menos 20 anos, os estudos apontaram que as proteínas Cry eram toxinas formadoras de poros, que induziriam à morte celular através da inserção na membrana e formação de poros iônicos, levando à lise osmótica das células intestinais e morte do inseto-alvo (Schnepf *et al*, 1998; Bravo *et al*, 2004; Boonserm *et al*, 2005). No entanto, um modelo proposto recentemente sugere que as proteínas Cry que compartilham os três domínios (família dos três domínios) não são formadoras de poro, mas toxinas que ativam uma cascata de sinalização, através de uma via mediada apenas pela interação das proteínas Cry com um receptor específico, chamado caderina (Zhang *et al*, 2005, Bulla *et al*, 2006).

1.3.1. Modelo da formação de poros

O modelo da formação de poros sugere que as larvas dos insetos suscetíveis ingerem o cristal de Cry, que se solubiliza no lúmen do intestino delgado do animal, devido ao alto pH e a condições redutoras lá encontradas. Após esta solubilização, as proteases do intestino médio do inseto clivam a protoxina nas porções C-terminal e N-terminal, resultando em uma toxina ativada de 60 kDa, com uma estrutura de três domínios (Schnepf *et al*, 1998). Estes monômeros se ligam aos receptores primários, que estão nas células do intestino médio da larva. O tipo do receptor primário varia conforme a especificidade da proteína. Por exemplo, Cry1A, tóxica para diversos lepidópteros, tem como receptor primário uma caderina (Bravo *et al*, 2004; Bulla *et al*, 2006). Depois, os monômeros se ligam aos receptores secundários, que são as proteínas ancoradoras glicosil-fosfatidil-inositol (GPI), como aminopeptidase N, no caso de *Manduca sexta*, e fosfatase alcalina, para o lepidóptero *Heliothis virescens*. Após essa ligação ao receptor secundário, o agora oligômero se insere na membrana, onde existem receptores para GPI, criando poros na membrana apical e causando choque osmótico, lise das células intestinais e morte do inseto (Schnepf *et al*, 1998; Bravo *et al*, 2004). A Figura 2 ilustra este modelo.

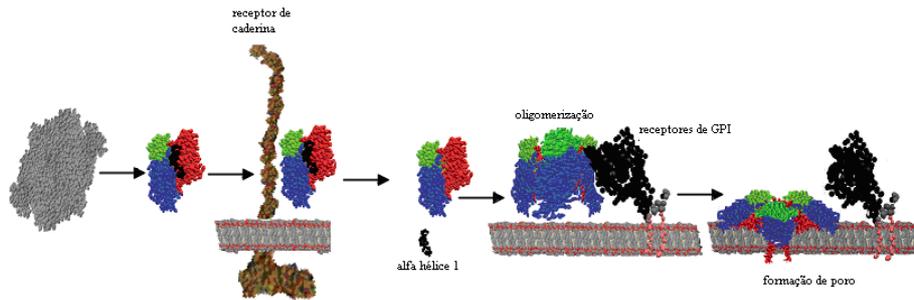


Figura 2: Mecanismo de ação da proteína Cry. Modelo da formação de poros. Modificado de Bravo e colaboradores (2009).

1.3.2. Modelo de transdução de sinal

O outro modelo proposto seria de que a toxicidade de Cry seria induzida através da ativação de uma cascata de sinalização dependente de Mg^{2+} , iniciada com a interação do monômero de Cry com o receptor primário, a proteína caderina (BT-R na Figura 3). Esta interação ativaria uma proteína G, que, por sua vez, ativaria a adenilato ciclase (AC na Figura 3), levando à produção de AMPc dentro das células. Este aumento de AMPc intracelular ativaria a proteína quinase A (PKA), levando à formação de bolhas na membrana, devido a alterações de citoesqueleto, surgimento de núcleos fantasmas e edema, culminando com a lise celular (Figura 4) (Bulla *et al*, 2006, Bravo *et al*, 2009).

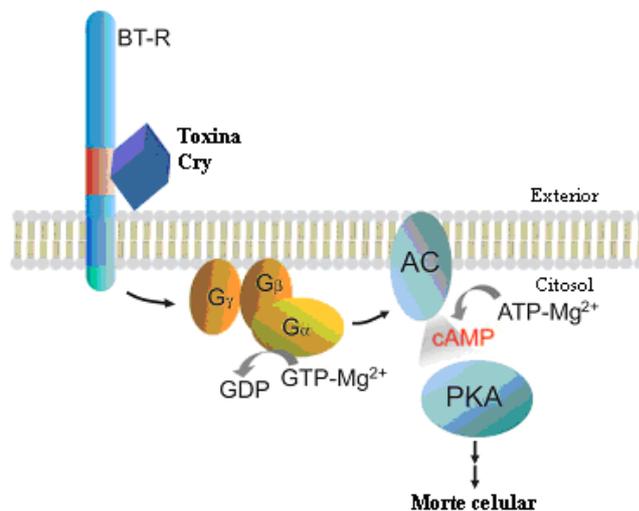


Figura 3: Mecanismo de ação da proteína Cry. Modelo da transdução de sinal. Modificado de Bulla e colaboradores (2006). (Abreviações: AC: adenilato ciclase, PKA: proteína quinase A, BT-R: receptor de caderina, $G\alpha$, $G\beta$ e $G\gamma$: proteína G subunidades α , β e γ , respectivamente, cAMP: adenosina monofosfato cíclico, $ATP-Mg^{2+}$: adenosina trifosfato, GDP : guanosina-difosfato, GTP : guanosina-trifosfato).

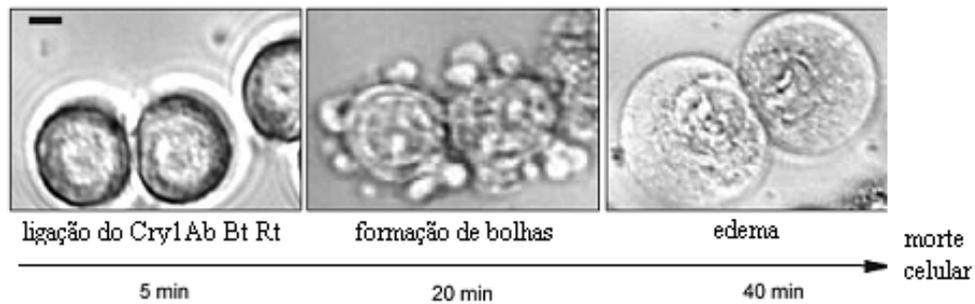


Figura 4: Sequência de alterações celulares durante a indução da morte celular pela toxina Cry1Ab. Modificado de Bulla e colaboradores (2006).

1.4. A produção de soja e o impacto da lagarta de *Anticarsia gemmatilis*

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja. Na safra 2008/09, a cultura ocupou uma área de 21,7 milhões de hectares, o que totalizou uma produção de 57,1 milhões de toneladas de grãos. Os Estados Unidos, maior produtor mundial do grão, respondeu pela produção de 80,5 milhões de toneladas de soja (Embrapa, 2010). Há a estimativa de que, até o ano de 2017, o Brasil se torne o maior produtor e exportador mundial de soja, retendo 34% de toda produção, seguido pelos EUA com 30% e Argentina com 20% (USDA, 2010).

A lagarta de *Anticarsia gemmatilis* Hubner é a praga de maior impacto sobre as lavouras de soja e representa 90% da população de lagartas que atacam essa cultura (Kogan *et al.*, 1976; Belarmino, 1987). A referida lagarta causa danos ao reduzir substancialmente a área foliar das plantas, promovendo significativa diminuição na produção de grãos. Uma única larva pode consumir mais de 110 cm² de folha de soja (Walker *et al.*, 2000). Para o controle desse inseto, têm sido utilizados, predominantemente, inseticidas químicos com até três aplicações por safra, ocasionando enormes prejuízos ambientais e custos elevados aos produtores. A utilização de inseticidas também causa a mortalidade dos inimigos naturais, isto é, de outros insetos que auxiliam no controle de pragas (Belarmino, 1987).

1.5. Uso de bioinseticidas

A possibilidade da ocorrência de resistência de insetos, somada a questões ambientais e de segurança, torna necessária a utilização de outros métodos para o controle das lagartas de *A. gemmatilis*, diferente da utilização de pesticidas químicos. Os inseticidas biológicos, utilizados há mais de 50 anos, têm sido a alternativa encontrada para a chamada agricultura

orgânica e para o controle mais seletivo de insetos. Bioinseticidas contra *A. gemmatalis*, baseados em formulações de esporos de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), demonstraram muitas vantagens sobre o uso de agentes químicos de controle, principalmente no que diz respeito à alta especificidade e toxicidade dessa bactéria a determinados insetos-praga, enquanto é atóxica a outros insetos, plantas e vertebrados (Ben-Dov *et al.*, 1997; Hongyu *et al.*, 2000). Apesar das vantagens, alguns problemas do uso de *Bt* sempre dificultaram sua aceitação pelo mercado, dentre eles: pouca estabilidade da proteína exposta a intempéries, ausência de translocação nas plantas, espectro limitado de ação e degradação rápida pela luz ultravioleta (Navon, 2000).

1.6. Plantas transgênicas expressando a proteína Cry

A possibilidade de gerar plantas transgênicas resistentes a insetos, através da introdução, nas mesmas, de genes de *Bt* codificadores de δ -endotoxinas, tornou-se uma realidade e vem sendo crescentemente explorada em diferentes países (Estruch *et al.*, 1997; Sharma *et al.*, 2000).

Em 1981, o primeiro gene *Cry* foi clonado e expresso em *Escherichia coli* (Schnepf e Whitley, 1981). Poucos anos depois, foi produzida a primeira planta de tomate com genes de *Bt* (Fischhoff, 1987). O milho Maximizer™ da Novartis, o algodão Bollgard™ e a batata Newleaf™ da Monsanto foram introduzidos no mercado norte-americano em 1995, sendo genericamente conhecidos como plantas-*Bt* (Jouanin *et al.*, 1998).

No Brasil, a CTNBio (Comissão Técnica Nacional de Biossegurança) já liberou o plantio de algodão e milho expressando proteínas Cry, o primeiro desde 2005 e o segundo desde 2007 (CTNBio, 2010).

Além do milho e do algodão, outras plantas cultivadas expressando uma ou várias proteínas Cry, para o controle de lepidópteros e coleópteros, estão em fase de desenvolvimento em laboratórios ou em testes de campo. Stewart e colaboradores (1996) obtiveram plantas transgênicas de soja expressando o gene *Cry1Ac* de *Bt*. Tais plantas apresentaram resistência aos insetos *Helicoverpa zea*, *Pseudoplusia includens*, *Heliothis virescens* e *Anticarsia gemmatalis*. Plantas de soja-*Bt* já são utilizadas nos Estados Unidos, mas ainda não obtiveram liberação no Brasil (Embrapa, 2010). No Brasil, plantas de soja expressando a proteína Cry1Ac já foram produzidas e se mostraram resistentes às lagartas de

Anticarsia gemmatalis, mas ainda não estão sendo utilizadas comercialmente (Homrich *et al.*, 2008).

Alguns trabalhos iniciais demonstraram que os genes codificadores das proteínas de *Bt* podem ser expressos em plantas, mas o nível das proteínas ativas nas plantas transformadas, quando utilizados os genes nativos, é relativamente baixo, com algumas exceções (Warren *et al.*, 1992), o que geralmente não é suficiente para uma proteção adequada contra insetos relevantes agronomicamente. Em virtude destas observações, esforços têm sido concentrados no incremento da expressão dos genes de *Bt* em plantas, na seleção de novas variantes de *Bt* mais ativas e/ou na modificação das sequências dos genes *Cry*, de maneira a aumentar a produção de toxinas no interior das plantas.

Genes *Cry* de *Bt* apresentam um alto conteúdo de bases adenina/timina (A/T) quando comparados a genes de plantas, que tendem a ter um alto conteúdo de bases guanina/citosina (G/C) (de Maagd *et al.*, 1999). Como consequência, os códons usuais dos genes de *Bt* são ineficientes em plantas, determinando a não tradução ou uma meia-vida do mRNA muito curta, o que leva à expressão reduzida destes genes. A modificação das sequências dos genes *Cry*, somada à seleção de novas variantes de *Bt* mais tóxicas, surge como uma alternativa promissora para contornar o problema de baixa proteção contra insetos em plantas transgênicas, contendo genes de *Bt*. A substituição de nucleotídeos na sequência codificadora dos genes *Cry1*, por meio de mutagênese *in vitro*, auxilia a correta leitura para a tradução em plantas, aumentando o nível de expressão destas proteínas. Entretanto, as modificações devem ser adequadas a cada espécie vegetal a ser transformada, sendo que a síntese deve gerar a mesma proteína do gene nativo (de Maagd *et al.*, 1999). Uma alternativa é a adição de tRNAs requeridos para a tradução efetiva dos códons preferenciais em plantas (Kumar *et al.*, 2005). Já no início da década de 90, foram obtidas plantas com aumento significativo da expressão dos genes de *Bt* e capazes de conferir efetivo controle de pragas do algodão (Perlak *et al.*, 1990), da batata (Perlak *et al.*, 1993) e do milho (Kozziel *et al.*, 1993), entre outras espécies.

1.7. Caracterização de isolados de *Bt* do Estado do Rio Grande do Sul

Bobrowski e colaboradores (2001, 2002) avaliaram, aproximadamente, 100 isolados de *B. thuringiensis* obtidos de amostras de solos da região Sul do Brasil. Destes, três apresentaram destaque por causarem mortalidade de larvas de *A. gemmatalis* superior a 90% (UNI981, UNI498 e UNI872). UNI872 e UNI498 apresentaram maior toxicidade e foram

caracterizados sorologicamente, sendo estas subespécies classificadas como *B. thuringiensis kurstaki* e *B. thuringiensis aizawai*, respectivamente. Foi constatada a presença de sequências semelhantes à do gene *Cry1* em ambos os isolados e a do gene *Cry2* no isolado UNI872.

1.8. Objetivos

Este trabalho teve como objetivos a clonagem e a expressão de um gene pertencente à família *Cry1A* da linhagem UNI498 de *Bacillus thuringiensis*, para posteriores bioensaios de toxicidade em lagartas de *Anticarsia gemmatalis*.

2. Material e métodos

2.1. Linhagem bacteriana

A linhagem de *Bt* utilizada para o isolamento de um gene pertencente à família *CryIA* foi *Bt* UNI498, a qual foi isolada a partir de amostras de solo do Estado do Rio Grande do Sul (Bobrowski *et al.*, 2001, 2002).

2.2. Cultivo e extração de plasmídeos

2.2.1. DNA plasmidial

As colônias de *Escherichia coli* selecionadas após procedimentos de ligação e transformação por eletroporação, foram inoculadas em meio LB com antibiótico. Após um período de 24 h a 37 °C sob agitação, as culturas bacterianas tiveram seus plasmídeos extraídos pelo Kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System® (Promega).

2.3. Oligonucleotídeos e reação em cadeia da polimerase (PCR)

2.3.1. Modelagem dos oligonucleotídeos reverso e direto

Oligonucleotídeos iniciadores já haviam sido projetados com base no alinhamento de sequências de genes *CryIAc* depositadas no GenBank, a fim de amplificar a região nucleotídica correspondente às regiões amino terminal e central da proteína. Estes iniciadores foram projetados contendo sítios para enzimas de restrição *Bam*HI e *Sal*I em suas extremidades, objetivando otimizar as futuras clonagens em vetores plasmidiais (Figuras 5 e 6). Visando a clonagem no vetor pENTR™/D-TOPO® um segundo oligonucleotídeo direto foi projetado, contendo a extensão CACC, apropriada para os eventos de recombinação sítio-específica. Visto que a região 3' não é muito conservada entre as sequências alinhadas, degenerações foram projetadas no oligonucleotídeo reverso nos sítios em que não havia consenso. Estes oligonucleotídeos amplificam um fragmento de aproximadamente 1900 pares de bases (pb).

2.3.2. Condições de amplificação do fragmento correspondente às regiões amino terminal e central da proteína Cry do DNA da linhagem UNI498 de *Bacillus thuringiensis*

A amplificação do fragmento de aproximadamente 1900 pb foi realizada por PCR, utilizando-se como molde DNA proveniente de fervura, por 5 minutos, de uma alíquota de 100 µl de uma cultura da bactéria UNI498 estocada em glicerol. Em todas as reações foram utilizados 5 µl do lisado bacteriano.

Parâmetros da reação com **Platinum® Taq DNA Pol** (Promega):

Desnaturação inicial: 94 °C – 5 min

94 °C – 1 min	}	30 ciclos
55 °C – 1 min		
72 °C – 2 min		

Extensão final: 72 °C – 5 min

4 °C – 10 min

A reação foi realizada no volume final de 25 µl.

Os reagentes encontravam-se nas seguintes concentrações finais: 1 U Platinum® Taq DNA Pol (Promega), Tampão de reação contendo 3 mM de MgCl₂, 1 mM dNTPs, 10 pmol de cada oligonucleotídeo (cry1for e cry1rev). O volume foi completado com água destilada.

Parâmetros da reação com **Pfx50™ DNA Pol** (Invitrogen):

Desnaturação inicial: 94 °C – 2 min

94 °C – 15 seg	}	30 ciclos
58 °C – 30 seg		
68 °C – 1 min		

Extensão final: 68 °C – 5 min

4 °C – 10 min

A reação foi realizada no volume final de 25 µl.

Os reagentes encontravam-se nas seguintes concentrações finais: 2,5 U Pfx50™ DNA Pol (Invitrogen), Tampão de reação contendo 0,3 mM de MgCl₂, 1 mM dNTPs, 0,3 µM de cada oligonucleotídeo (direto para pENTR e cry1rev). O volume foi completado com água destilada.

2.4. Clonagem em vetores plasmidiais

2.4.1. Clonagem e sequenciamento do fragmento correspondente às regiões amino terminal e central da proteína Cry em vetor plasmidial pGEM® T-Easy (Promega)

A amplificação do fragmento de aproximadamente 1900 pb foi realizada por PCR, utilizando-se como molde o DNA da bactéria UNI498, os iniciadores direto e reverso e Platinum® Taq DNA Pol (Promega).

O produto da reação de PCR foi purificado utilizando-se o kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega), segundo instruções do fabricante. Esse foi ligado ao vetor pGEM® T Easy (Promega). A reação de ligação foi utilizada para transformação de bactérias *E. coli* TOP 10 eletrocompetentes, por eletroporação. As colônias transformantes tiveram seus plasmídeos extraídos. A presença do fragmento correspondente ao gene *CryIA* foi confirmada por PCR, nas condições já descritas. O plasmídeo recombinante foi denominado pGEM-Cry1A.

Três dos plasmídeos obtidos (pGEM-Cry1A) foram enviados para sequenciamento. Os oligonucleotídeos direto e reverso universais do pUC18/M13 foram utilizados como iniciadores da reação de sequenciamento. As sequências obtidas foram analisadas com o programa BLASTn, disponível no Centro Nacional de Informações Biotecnológicas dos Estados Unidos (NCBI-USA).

2.4.2. Clonagem e sequenciamento do fragmento correspondente às regiões amino terminal e central da proteína Cry em vetor pENTR™/D-TOPO® (Invitrogen)

Paralelamente à clonagem do fragmento de 1900 pb amplificado no vetor pGEM® T Easy (Promega) foi realizada a clonagem desse fragmento no vetor pENTR™/D-TOPO® (Invitrogen). Neste caso, o fragmento foi amplificado por PCR, utilizando-se como molde o DNA da bactéria UNI498, os iniciadores direto para o p-ENTR e reverso e Pfx50™ DNA Pol (Invitrogen).

O produto da reação de PCR foi purificado utilizando-se o kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega), segundo instruções do fabricante. Este foi ligado ao vetor pENTR™/D-TOPO® (Invitrogen). A reação de ligação foi utilizada para transformação de bactérias *E. coli* TOP 10 eletrocompetentes, por eletroporação. As colônias transformantes

tiveram seus plasmídeos extraídos. A presença do fragmento correspondente ao gene *CryIA* foi confirmada por PCR, nas condições já descritas. O plasmídeo recombinante foi denominado pENTR-Cry1A.

Um dos clones obtidos (pENTR-Cry1A) foi enviado para sequenciamento. Os oligonucleotídeos direto e reverso universais do fago T7 foram utilizados como iniciadores da reação de sequenciamento. A sequência obtida foi analisada com o programa BLASTn, disponível no Centro Nacional de Informações Biotecnológicas dos Estados Unidos (NCBI-USA).

2.4.3. Clonagem e expressão do fragmento correspondente às regiões amino terminal e central da proteína Cry nos vetores de expressão pGEX® 4T3 e pET-23a(+)

Os vetores plasmidiais pGEX 4T3®, pET-23a(+), juntamente com o plasmídeo pGEM-Cry1A, foram inicialmente clivados com a enzima de restrição *SalI* (Promega) e purificados com kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega). Em seguida, os plasmídeos foram clivados com a enzima *BamHI* (Promega). As reações de clivagem foram purificadas novamente com o mesmo kit.

O fragmento contendo parte do gene *CryIA* foi ligado ao vetor pGEX 4T3® ou ao vetor pET-23a(+)® através dos sítios de *SalI* e *BamHI* e a reação foi utilizada para transformação de bactérias *E. coli* TOP 10 eletrocompetentes, por eletroporação.

As colônias transformantes tiveram seus plasmídeos extraídos. A presença do fragmento correspondente ao gene *CryIA* foi confirmada por PCR, nas condições já descritas. Os plasmídeos recombinantes foram denominados pGEX-Cry1A e pET-Cry1A.

Um representante de cada tipo de plasmídeo (pGEX-Cry1A e pET-Cry1A) foi utilizado para transformação de bactérias *E. coli* BL21(DE3) Ril eletrocompetentes por eletroporação. As colônias transformantes foram inoculadas em meio líquido e posteriormente induzidas.

2.5. Análise das sequências obtidas por ferramentas de bioinformática

Todos os clones plasmidiais obtidos foram sequenciados no laboratório ACTGene do Centro de Biotecnologia, UFRGS, RS, no sequenciador automático ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Após a obtenção das sequências de nucleotídeos de

ambos os lados dos fragmentos de aproximadamente 1900 pb clonados em pGEM T Easy, estas foram analisadas através dos programas Clustal_X (Thompson *et al.*, 1997) e *BioEdit Sequence Alignment Editor 7.0.9.0* (Hall, 1999). As sequências foram manualmente corrigidas e uma delas foi utilizada para as comparações com outras sequências de genes *CryIA* disponíveis no banco de dados, tanto em nível de nucleotídeos como de aminoácidos.

As sequências de aminoácidos derivadas das sequências de nucleotídeos obtidas também foram utilizadas para a construção de árvores filogenéticas, visando identificar a qual subfamília de genes *CryIA* pertence o fragmento isolado a partir do DNA da linhagem UNI498 de *B. thuringiensis*. Para a construção das árvores filogenéticas foram utilizados os métodos de *neighbour joining* (Saitou e Nei, 1987) e UPGMA, com análises de bootstrap com 1000 repetições. O programa Mega, versão 2.1.0 (Kumar *et al.*, 2001) foi utilizado para estas análises.

2.6. Indução da expressão de proteínas

2.6.1. Indução da expressão de proteínas em bactérias *E. coli* BL21(DE3) Ril eletrocompetentes

Colônias de *E. coli* contendo os clones recombinantes de pET-23a(+)[®] e pGEX[®] 4T3[®] (pGEX-Cry1A e pET-Cry1A, respectivamente) foram cultivadas em meio líquido, com agitação de 120 rpm, à temperatura de 37 °C até atingirem a densidade óptica de 0.6, medida na absorbância de 600 nm. Estas culturas foram, então, induzidas com 1 mM de IPTG durante 6 horas para a expressão de proteínas. Como controles foram utilizadas culturas da bactéria *E. coli* BL21(DE3) Ril contendo ou não os vetores de expressão sem o inserto, induzidas ou não induzidas com IPTG.

2.6.2. Análise da expressão de proteínas em gel de poliacrilamida

As culturas bacterianas induzidas e não induzidas foram centrifugadas por 5 min. a 5.000 rpm. Os precipitados foram suspensos em SDS Buffer (20 mM Tris-Cl, 100 mM NaCl, 70 mM EDTA e 2% SDS), fervidos durante 3 minutos e, então, colocados em gelo. Os extratos proteicos foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

10%. Após a corrida, o gel foi corado com Coomassie Blue G-250® (Sigma). Como marcador de peso molecular foi utilizado o BenchMark™ Protein Ladder (Invitrogen).

3. Resultados e discussão

3.1. Modelagem dos oligonucleotídeos reverso e direto

Dentre as possíveis estratégias para o isolamento de um gene, foi utilizada a que combina a técnica de reação em cadeia da polimerase para amplificação de um fragmento específico, com a sucessiva clonagem deste fragmento em vetor apropriado. Visto que existem várias sequências de genes *CryIA* disponíveis no GenBank e que outros trabalhos já descreveram o isolamento de genes *Cry* via PCR (Dardenne *et al.*, 1990; Qiao *et al.*, 1993), esta estratégia mostrou-se a mais conveniente para o isolamento de um gene pertencente à família *CryIA* do genoma de uma linhagem de *Bt* isolada no Estado do RS. A linhagem UNI498 foi escolhida devido a sua elevada toxicidade a larvas de *A. gemmatalis* (Bobrowski *et al.* 2001, 2002).

Considerando que a região C-terminal das proteínas *Cry* está basicamente envolvida na formação do cristal proteico durante o estágio de esporulação do bacilo e, pouco se relaciona com a toxidez; o trabalho focou-se na clonagem da sequência nucleotídica correspondente às regiões N-terminal e central, as quais são responsáveis pela toxidez da proteína. (Perlak *et al.*, 1991; Bravo *et al.*, 2002)

Tratando-se do isolamento de uma sequência gênica incompleta, houve a preocupação em evitar-se a exclusão de nucleotídeos da região 3' envolvidos na codificação do terceiro domínio da proteína, região fundamental à atividade desta. Para isso, foram analisados outros trabalhos que isolaram sequências truncadas de genes *CryIA*, e que tiveram sucesso quanto à conservação da atividade da toxina. O tamanho médio entre as sequências isoladas nestes trabalhos foi de 1883 pb (Dardenne *et al.*, 1990; Qiao *et al.*, 1993; Masson, *et al.*, 1994).

3.2. Amplificação do fragmento correspondente às regiões amino terminal e central da proteína *Cry* do DNA da linhagem UNI498 de *Bacillus thuringiensis*

Após a realização da amplificação nas condições descritas no item 2.3.2 foi obtido um fragmento de aproximadamente 1900 pb (Figura 7).

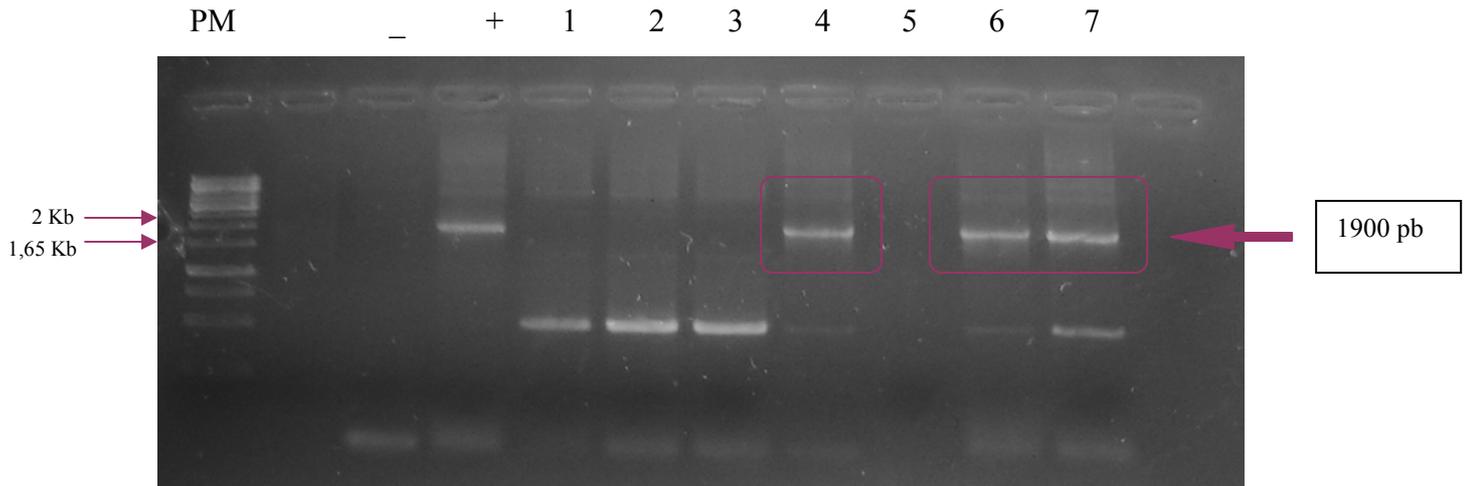


Figura 8: Gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio, mostrando o resultado da reação de amplificação com os oligonucleotídeos específicos para *CryIA* de plasmídeos extraídos de algumas colônias transformantes de pGEM-Cry1A (canaletas de 1 a 7). O sinal + indica a amplificação de um fragmento correspondente a um gene *CryIAc* disponível no laboratório; o sinal - corresponde ao controle negativo da reação (sem DNA). As bandas circuladas foram as que apresentaram o fragmento de 1900 pb. PM = Marcador de peso molecular, 1,0 Kb Ladder.

Os três clones de pGEM-Cry1A que apresentaram o fragmento de 1900 pb na amplificação por PCR foram enviados para sequenciamento.

3.4. Clonagem e sequenciamento do fragmento correspondente às regiões amino terminal e central da proteína Cry em vetor pENTR™/D-TOPO® (Invitrogen)

Paralelamente foi realizada a clonagem do fragmento de aproximadamente 1900 pb no vetor pENTR™/D-TOPO® (Invitrogen). As colônias transformantes tiveram seus plasmídeos extraídos e a presença do fragmento correspondente ao gene *CryIA* foi confirmada por PCR, nas condições já descritas (Figura 9).

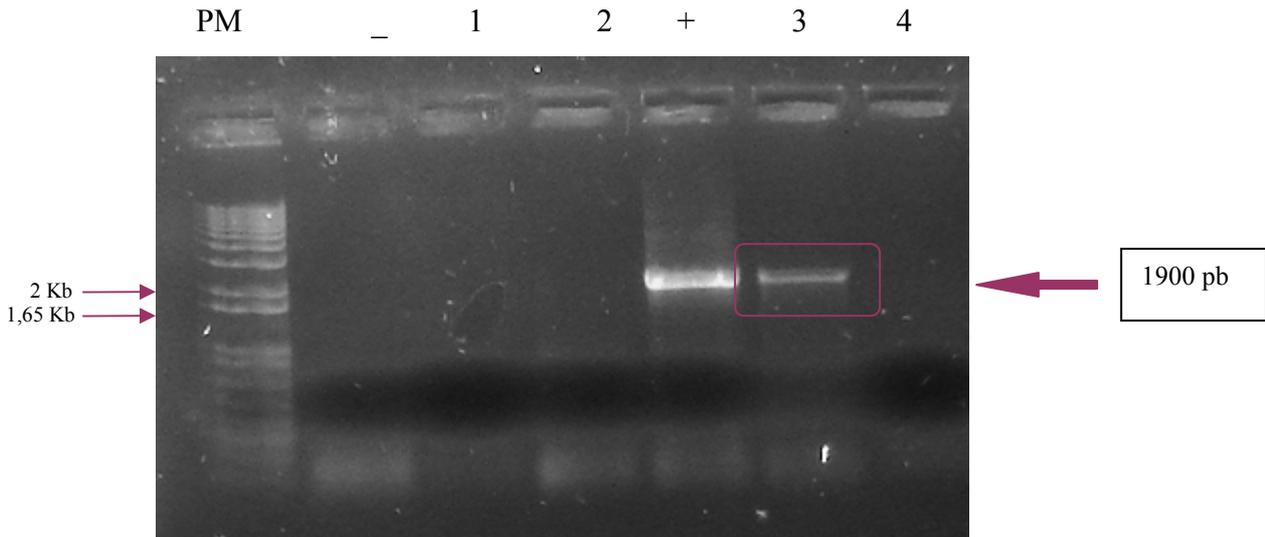


Figura 9: Gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio, mostrando o resultado da reação de amplificação com os oligonucleotídeos específicos para *CryIA* de plasmídeos extraídos de algumas colônias transformantes de pENTR-Cry1A (canaletas de 1 a 4). O sinal + indica a amplificação de um fragmento correspondente a um gene *CryIAc* disponível no laboratório; o sinal - corresponde ao controle negativo da reação (sem DNA). A banda circutada foi a que apresentou o fragmento de 1900 pb. PM = Marcador de peso molecular, 1,0 Kb Ladder.

O sequenciamento do clone pENTR-Cry1A foi realizado, entretanto, a sequência do vetor plasmidial pENTR não foi confirmada, sendo a amostra descartada (dado não mostrado).

3.5. Análise das sequências obtidas por ferramentas de bioinformática

As sequências de nucleotídeos obtidas a partir do sequenciamento dos fragmentos de aproximadamente 1900 pb presentes nos clones pGEM-Cry 04, pGEM-Cry 06 e pGEM-Cry 07 corresponderam a 887 nucleotídeos da região 5' e a 835 nucleotídeos da região 3'. A comparação entre as sequências obtidas dos três clones de pGEM confirmou que eles se tratavam de clones idênticos (Figuras 1 e 2 do Apêndice). Após as correções, apenas a sequência do clone pGEM-Cry-04 foi utilizada para as demais comparações.

Quando as sequências do clone pGEM-Cry-04 foram alinhadas (tanto em nível de nucleotídeos como em nível de aminoácidos) com outras sequências de genes e proteínas Cry verificou-se que faltaram apenas cerca de 132 nucleotídeos (ou 44 aminoácidos) para que o fragmento clonado fosse totalmente sequenciado. Assim, o tamanho esperado do fragmento clonado é de 1854 nucleotídeos (887 da região 5' + 835 da região 3' + 132 nucleotídeos que faltam).

As sequências de nucleotídeos e aminoácidos (derivadas das sequências de nucleotídeos) do clone pGEM-Cry 04 foram analisadas no programa BLASTn e BLASTp do

NCBI. As melhores homologias e similaridades foram obtidas com as sequências EU447666, correspondente a um gene *CryIAc*, e AF510713 e AF384211, ambas correspondentes a genes *CryIAa*. Estas sequências foram alinhadas com as sequências do clone pGEM-Cry-04, juntamente com a sequência identificada pelo número AY225453, que corresponde a um gene *CryIAc*, utilizada nos primeiros estudos de comparação de sequências de genes *Cry* disponíveis no GenBank e por ter sido uma das sequências utilizadas para a confecção dos *primers* (Figuras 3, 4, 5 e 6 do Apêndice).

Uma identidade de 99% foi obtida entre os 887 nucleotídeos da região 5' do clone pGEM-Cry-04 com a sequências de *CryIAa* do acesso AF510713 e *CryIAc* do acesso EU447666. Quando comparadas em nível de aminoácidos, os 295 aminoácidos derivados dos 887 nucleotídeos também apresentaram altos níveis de identidade e similaridade (97% e 98%, respectivamente, para ambas as sequências do GenBank).

Os 835 nucleotídeos da região 3' também foram analisados e apresentaram 97% de identidade com a região correspondente das sequências de *CryIAa* (AF510713 e AF384211) e *CryIAc* (EU447666). As comparações em nível de aminoácidos também apresentaram alta identidade e similaridade (96% de identidade e similaridade) para as três sequências.

Um nível bem mais baixo de identidade e similaridade foi observado entre as sequências do clone pGEM-Cry-04 e as sequências de nucleotídeos e aminoácidos do acesso AY225453, especialmente na região 3' do fragmento isolado. As Tabelas 1 e 2 sumarizam os dados obtidos com as comparações das sequências do clone pGEM-Cry-04 com as sequências do GenBank, tanto em nível de nucleotídeos quanto de aminoácidos.

Tabela 1: Comparações entre as sequências de nucleotídeos e aminoácidos da região 5' do fragmento de 1854 pb obtido de *Bt* UNI498 (Cry 04 for) com sequências de genes *CryIAa* e *CryIAc* e suas respectivas sequências de aminoácidos.

	Cry 04 for (295)		EU447666 (296)		AF510713 (296)		AF384211 (296)		AY225453 (296)	
	ID (%)	SIM (%)	ID (%)	SIM (%)	ID (%)	SIM (%)	ID (%)	SIM (%)	ID (%)	SIM (%)
Cry 04 for (887)	—	—	97	98	97	98	97	98	96	97
EU447666 (890)	99	—	—	—	100	100	100	100	98	98
AF510713 (890)	98	—	100	—	—	—	100	100	98	99
AF384211 (890)	99	—	100	—	100	—	—	—	98	99
AY225453 (890)	96	—	98	—	98	—	99	—	—	—

ID: grau de identidade. SIM: grau de similaridade. Os números entre parênteses na primeira linha significam o número de aminoácidos analisados e o número entre parênteses na primeira coluna são os nucleotídeos analisados.

Tabela 2: Comparações entre as sequências de nucleotídeos e aminoácidos da região 3' do fragmento de 1854 pb obtido de *Bt* UNI498 (Cry 04 rev) com sequências de genes *CryIAa* e *CryIAc* e suas respectivas sequências de aminoácidos.

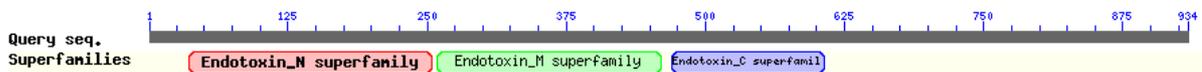
	Cry 04 rev (278)		EU447666 (280)		AF510713 (280)		AF384211 (280)		AY225453 (282)	
	ID (%)	SIM (%)	ID (%)	SIM (%)	ID (%)	SIM (%)	ID (%)	SIM (%)	ID (%)	SIM (%)
Cry 04 rev (835)	—	—	96	96	96	96	96	96	49	60
EU447666 (842)	97	—	—	—	100	100	100	100	50	61
AF510713 (842)	97	—	100	—	—	—	100	100	50	61
AF384211 (842)	97	—	100	—	100	—	—	—	50	61
AY225453 (848)	58	—	59	—	59	—	59	—	—	—

ID: grau de identidade. SIM: grau de similaridade. Os números entre parênteses na primeira linha significam o número de aminoácidos analisados e o número entre parênteses na primeira coluna são os nucleotídeos analisados.

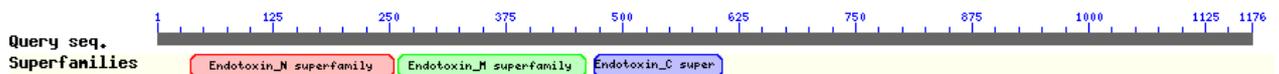
Apesar de faltarem 132 nucleotídeos para o completo sequenciamento do fragmento de 1854 pb isolado de *Bt* UNI498, as análises das sequências parciais indicam que o gene isolado dessa linhagem de *Bt* seja pertencente à subfamília *CryIAa*, e não à subfamília *CryIAc*, como se pensava inicialmente. Essa análise também indica que se trata de um gene novo, ainda não descrito na literatura.

Embora o fragmento de 1854 pb não tenha sido totalmente sequenciado, a região obtida permitiu análises mais detalhadas da sequência de aminoácidos derivada deste. Quando analisada em nível de proteína foi possível contatar que os três domínios importantes para o funcionamento da toxina Cry estão presentes no fragmento amplificado e que esse é, provavelmente, suficiente para exercer os efeitos tóxicos contra insetos suscetíveis. A Figura 10 mostra os três domínios importantes nas proteínas Cry1Aa e Cry1Ac inteiras (disponível no GenBank) e os domínios identificados nas regiões sequenciadas do fragmento de 1854 pb isolado nesse trabalho.

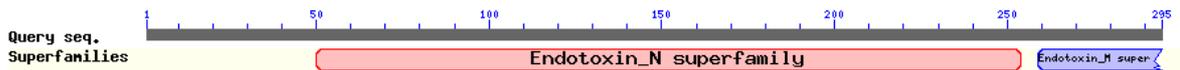
Domínios conservados da toxina Cry1Aa completa, acesso P0A369: 934 aminoácidos



Domínios conservados da toxina Cry1Ac completa, acesso U447666: 1176 aminoácidos



Domínios representados no clone 04 FOR: 295 aminoácidos



Domínios representados no clone 04 REV: 278 aminoácidos

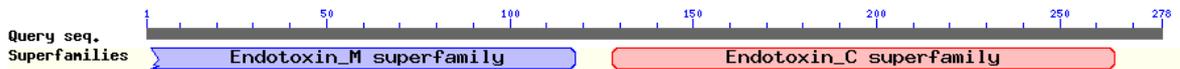


Figura 10: Representação esquemática dos três domínios importantes das proteínas Cry1Aa e Cry1Ac para a sua atividade inseticida e os respectivos domínios nas regiões disponíveis do clone pGEM-Cry-04.

A fim de confirmar a qual subfamília de genes *Cry1A* pertence a sequência identificada no fragmento de 1854 pb clonado foi realizada uma análise filogenética das sequências de aminoácidos derivadas das sequências de nucleotídeos obtidas, tanto da região 5' quanto da região 3' do clone pGEM-Cry-04 com as respectivas regiões de sequências de proteínas Cry1A. Foram selecionadas sequências de proteínas Cry1A de diversas subfamílias e cuja identificação estava bem estabelecida no GenBank. A Figura 11 mostra as árvores

obtidas através do método de *Neighbor-joining*. Uma árvore filogenética obtida através do método de UPGMA é apresentada na Figura 7 do Apêndice.

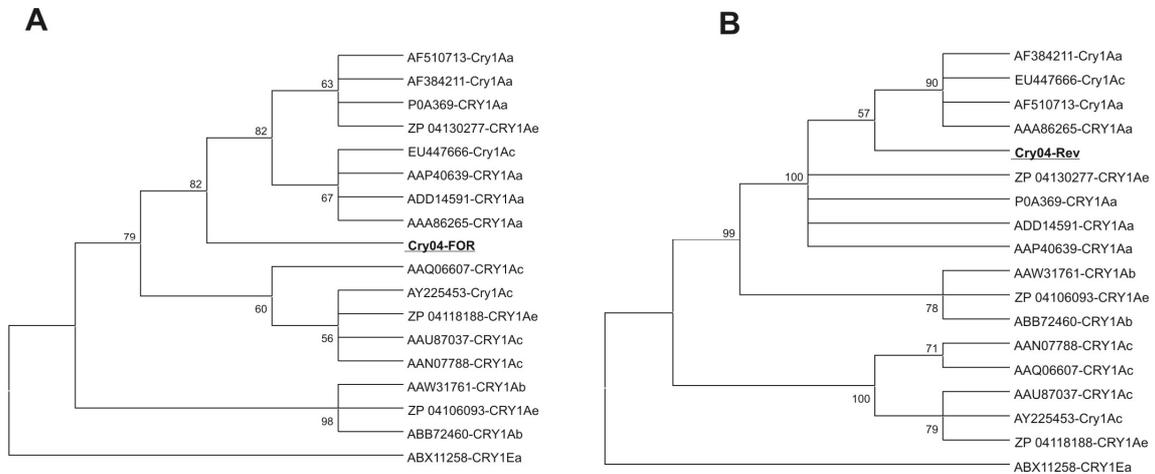


Figura 11: Árvores filogenéticas obtidas pelo método de *Neighbor-joining* usando em (A) a sequência de aminoácidos correspondente à porção 5' e em (B) a sequência de aminoácidos correspondente à porção 3' do fragmento isolado da linhagem *Bt* UNI498 e diversas sequências de proteínas Cry1A disponíveis no GenBank. O número de acesso e a subfamília de cada proteína Cry estão indicados.

Como pode ser observado, a região 5', por ser muito conservada entre todas as subfamílias, não serve para identificar, com confiança, qual subfamília pertence a sequência do clone pGEM-Cry-04. Já a região 3', por ser bem menos conservada, permitiu o posicionamento da sequência do clone pGEM-04 mais próximo às sequências de proteínas pertencentes à subfamília Cry1Aa. Dessa forma, os dados obtidos nesse trabalho indicam que o fragmento de 1854 pb isolado da linhagem *Bt* UNI498 contém um gene pertencente à subfamília *Cry1Aa* das enterotoxinas Cry.

3.6. Clonagem e expressão do fragmento correspondente às regiões amino terminal e central da proteína Cry nos vetores de expressão pGEX® 4T3 e pET-23a(+)[®]

Com a falta de resultados positivos com o vetor pENTR™/D-TOPO®, iniciou-se a clonagem do fragmento do clone pGEM-Cry1 nos vetores de expressão pGEX 4T3® e pET-23a(+)[®]. As colônias transformantes tiveram seus plasmídeos extraídos e a presença do fragmento correspondente ao gene *Cry1A* foi confirmada por PCR, nas condições já descritas (Figuras 12 e 13).

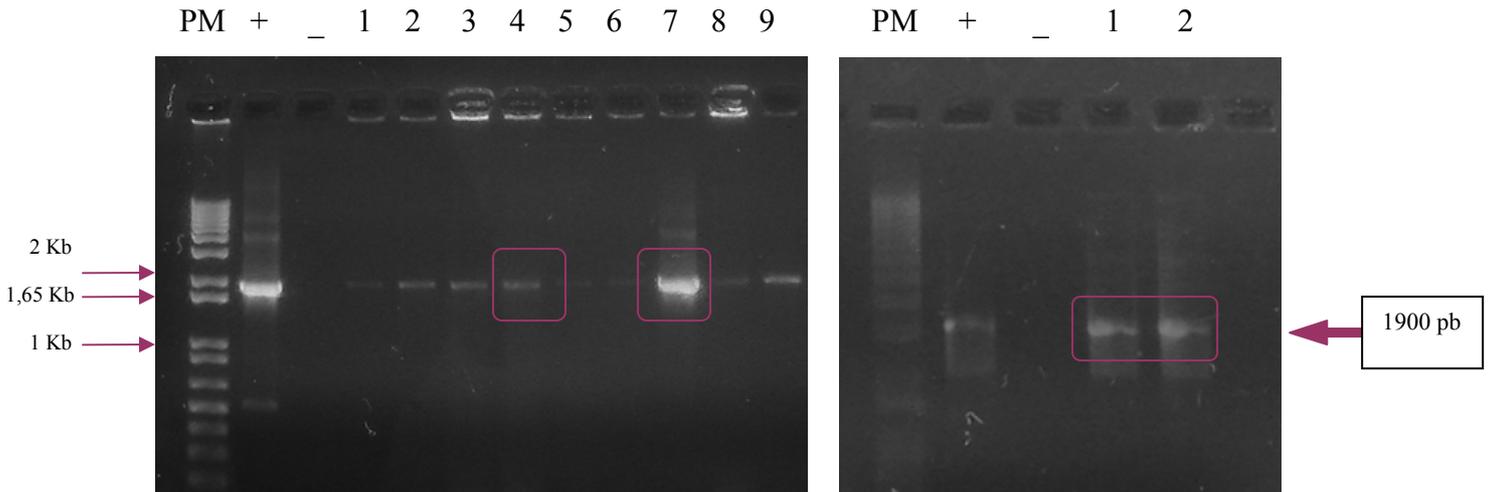


Figura 12: Gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio, mostrando o resultado da reação de amplificação com os oligonucleotídeos específicos para *CryIAC* de plasmídeos extraídos de algumas colônias transformantes de pGEX-Cry1A (canaletas 1-9). O sinal + indica a amplificação de um fragmento correspondente a um gene *CryIAC* disponível no laboratório; o sinal - corresponde ao controle negativo da reação (sem DNA). As bandas circuladas foram as que apresentaram o fragmento de 1900 pb. Marcador de peso molecular: Ladder 1,0 Kb.

Figura 13: Gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio, mostrando o resultado da reação de amplificação com os oligonucleotídeos específicos para *CryIAC* de plasmídeos extraídos de algumas colônias transformantes de pET-Cry1A (canaletas 1 e 2). O sinal + indica a amplificação de um fragmento correspondente a um gene *CryIAC* disponível no laboratório; o sinal - corresponde ao controle negativo da reação (sem DNA). A banda circulada foi a que apresentou o fragmento de 1900 pb. Marcador de peso molecular: Ladder 1,0 Kb.

Os clones recombinantes pGEX-Cry1A e pET-Cry1A tiveram sua expressão de proteínas induzida, entretanto, como pode-se observar no gel da Figura 14, nenhum deles expressou a proteína Cry recombinante. Apenas a banda correspondente à proteína GST do vetor pGEX foi identificada, o que comprovou que o processo de indução foi bem realizado, mas que esse clone não continha a proteína Cry-GST esperada. No caso do vetor pGEX, a proteína recombinante Cry-GST teria um tamanho aproximado de 94 kDa e para o vetor pET, a proteína Cry-His teria um tamanho aproximado de 69 kDa. Nenhuma banda com estes tamanhos pode ser identificada como sendo uma banda resultante da indução do gene clonado nos vetores em *E. coli*.

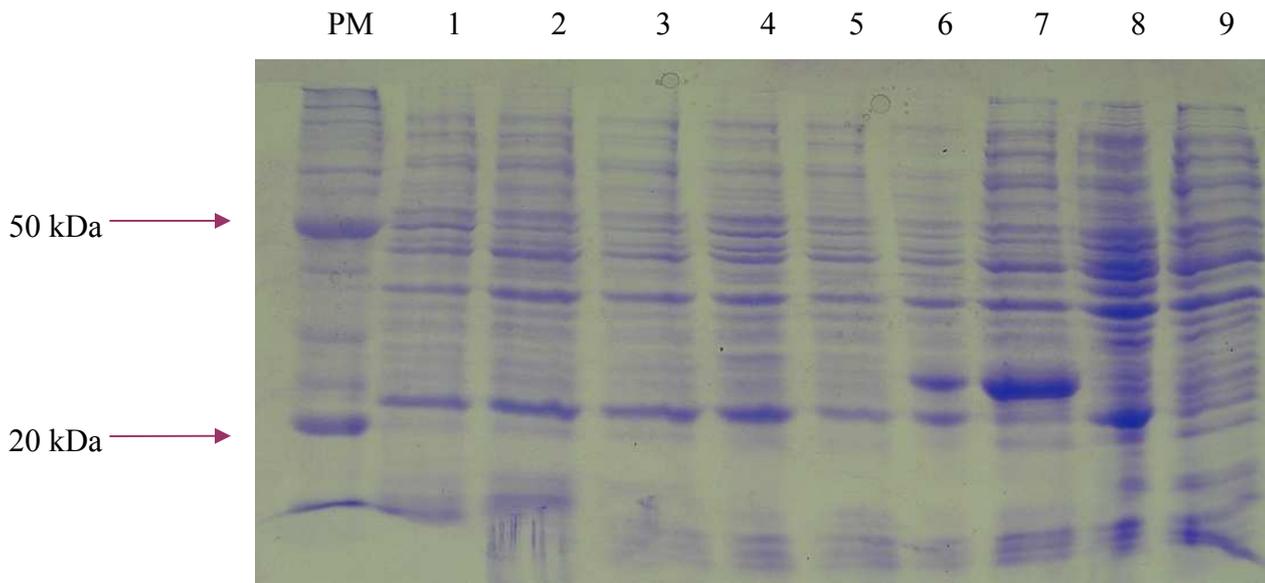


Figura 14: Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 10%, corado com Coomassie Blue G-250® (Sigma). Canaletas 1 – 9: 1: BL21(DE3) Ril não induzida, 2: pET-23a(+)[®] não induzida, 3: pGEX[®] 4T3[®] não induzida, 4 e 5: BL21(DE3) Ril induzida, 6 e 7: pGEX-Cry1A induzido, 8 e 9: pET-Cry1A induzido. PM: marcador de peso molecular BenchMark[™] Protein Ladder (Invitrogen).

4. Perspectivas

Como continuidade deste trabalho será feita uma nova tentativa de clonagem do fragmento de 1854 pb no vetor de expressão p-ENTR. O plasmídeo recombinante será, então, utilizado para um experimento de recombinação com um novo vetor pET16b disponível no laboratório, utilizando-se o sistema Gateway. A fim de garantir a correta tradução do fragmento inserido neste novo vetor, outro oligonucleotídeo reverso será projetado, contendo um códon de terminação da tradução (STOP códon) na sua região terminal.

Será realizada, também, a confecção de iniciadores internos, visando o sequenciamento dos 132 nucleotídeos que faltam para finalizar o sequenciamento completo do fragmento de 1854 pb. Com isso acreditamos que a identidade do fragmento de Cry de *Bt* UNI498 poderá ser confirmada.

A expressão da proteína Cry1A, identificada neste trabalho, em *E. coli* permitirá a realização de experimentos de bioensaio com larvas de *A. gemmatalis*, para a verificação da atividade inseticida da proteína Cry1A isolada.

5. Referências bibliográficas

BELARMINO, L. C. **Efeitos da aplicação de inseticidas químicos e biológicos para o controle de *Anticarsia gemmatalis* Hubner, 1818 (Lepidoptera, Noctuidae) na cultura da soja, *Glycine max* (L.) Merril.** 1987. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

BEN-DOV, E.; ZARITSKY, A.; DAHAN, B.; BARAK, Z.; SINAI, R.; MANASHEROB, R.; KHAMRAEV, A.; TROITSKAYA, E.; DUBITSKY, A.; BEREZINA, N.; MARGALITH, Y. Extend screening by PCR for seven *cry*-group genes from field-collected strains of *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, n. 63, p. 4883-4890, 1997.

BERLINER, E. Über die Schlaffsucht der Mehlmottenraupe (*Ephestia kuhniella* Zell) und ihren Erreger *Bacillus thuringiensis* sp. **Zeitschrift für Angewandte Entomologie**, n. 2, p. 29-56, 1915.

BOBROWSKI, V. L.; PASQUALI, G.; BODANESE-ZANETTINI, M. H.; FIUZA, L. M. Detection of *cry1* genes in *Bacillus thuringiensis* isolates from south of Brazil and activity against *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Brazilian Journal of Microbiology**, n. 32, p. 105-109, 2001.

BOBROWSKI, V. L.; PASQUALI, G.; BODANESE-ZANETTINI, M. H.; PINTO, L. M. N.; FIUZA, L. M. Characterization of two *Bacillus thuringiensis* isolates from south Brazil and their toxicity against *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Biological Control**, n. 25, p. 129-135, 2002.

BOONSERM, P.; DAVIS, P.; ELLAR, D.J.; LI, J. Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications. **Journal of Molecular Biology**, n. 348, p. 363–382, 2005.

BOONSERM, P.; MO, M.; ANGSUTHANASOMBAT, CH.; LESCAR, J. Structure of the functional form of the mosquito larvicida Cry4Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* at a 2.8-Å resolution. **The Journal of Bacteriology**, n.188, p. 3391–3401, 2006.

BRAVO, A.; GOMEZ, I.; CONDE, J.; MUÇOZ-GARAY, C.; SANCHEZ, J.; MIRANDA, R.; ZHUANG, M.; GILL, S. S.; SOBERON, M. Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. **Biochimica et Biophysica Acta**, n. 1667, p. 38–46, 2004.

BRAVO, A.; GILL, S.S.; SOBERON, M. *Bacillus thuringiensis*: Mechanisms and Use. **Comprehensive Molecular Insect Science**, n. 6, p. 175–206, 2005.

BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERO'n, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, n. 49, p. 423–435, 2007.

BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERO'n, M. Signaling versus punching hole: How do *Bacillus thuringiensis* toxins kill insect midgut cells? **Cellular and Molecular Life Science**, n. 66, p. 1337–1349, 2009.

BULLA, L. A. JR.; ZHANG, X.; CANDAS, M.; GRIKO, N. B.; TAISSING, R. A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, n. 103, p. 9897–9902, 2006.

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 and Environmental Microbiology**, n. 57, p. 3057-3061, 1991.

DE MAAGD, R. A.; BOSHC, D.; STIEKEMA, W. *Bacillus thuringiensis* toxin-mediated insect resistance in plants. **Trends in Plant Science**, n. 14, p. 9-13, 1999.

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

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

FISCHHOFF, D. A. Insect tolerant transgenic tomato plants. **Bio/Technology**, n. 5, p. 807–813, 1987.

GALITSKY, N.; CODY, V.; WOJTCZAK, A.; GHOSH, D.; LUFT, J.R.; PANGBORN, W.; ENGLISH, L. Structure of the insecticidal bacterial d-endotoxin CryBb1 of *Bacillus thuringiensis*. **Acta Crystallographica**, n. 57, p. 1101–1109, 2001.

GROCHULSKI, P.; MASSON, L.; BORISOVA, S.; PUSZTAI-CAREY, M.; SCHWARTZ, J.L.; BROUSSEAU, R.; CYGLER, M. *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. **Journal of Molecular Biology**, n. 254, p. 447–464, 1995.

GUO, S.; YE, S.; LIU, Y.; WEI, L.; XUE, J.; WU, H.; SONG, F.; ZHANG, J.; WU, X.; HUANG, D.; RAO, Z. Crystal structure of *Bacillus thuringiensis* Cry8Ea1: An insecticidal toxin toxic to underground pests, the larvae of *Holotrichia parallela*. **Journal of Structural Biology**, n. 168, p. 259–266, 2009.

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

HERRERO, S.; GONZALEZ-CABRERA, J.; FERRE, J.; BAKKER, P. L.; and DE MAAGD, R. A. Mutations in the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca toxin demonstrate the role of domains II and III in specificity towards *Spodoptera exigua* larvae. **The Biochemical Journal**, n. 384, p. 507–513, 2004.

HOMRICH, M. S.; PASSAGLIA, L. M. P.; PEREIRA, J. F.; BERTAGNOLLI, P. F.; PASQUALI, G.; ZAIDI, M. A.; ALTOSAAR, I.; BODANESE-ZANETTINI, M. H. Resistance to *Anticarsia gemmatilis* Hubner (Lepidoptera, Noctuidae) in transgenic soybean (*Glycine max* (L.) Merrill Fabales, Fabaceae) cultivar IAS5 expressing a modified Cry1Ac endotoxin. **Genetics and Molecular Biology**, n. 31, p. 522–531, 2008.

HONGYU, Z.; ZINIU, Y.; WANGXI, D. Composition and ecological distribution of Cry protein and their genotypes of *Bacillus thuringiensis* isolates from warehouses in China. **Journal of Invertebrate Pathology**, n. 76, p. 191–197, 2000.

JIMENEZ-JUAREZ, N.; MUNOZ-GARAY, C.; GOMEZ, I.; SAAB-RINCON, G., DAMIAN-ALMAZO, J. Y.; GILL, S. S.; SOBERON, M.; BRAVO, A. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab Mutants Affecting Oligomer Formation Are Non-toxic to *Manduca sexta* Larvae. **The Journal of Biological Chemistry**, n. 282, p. 21222–21229, 2007.

JOUANIN, L.; BONADÉ-BOTTINO, M.; GIRARD, C.; MORROT, G.; GIBAND, M. Transgenic plants for insect resistance. **Plant Science**, n. 131, p. 1–11, 1998.

KNOWLES, B.H.; DOW, J.A.T. The crystal delta-endotoxins of *Bacillus thuringiensis* – models for their mechanism of action on the insect gut. **BioEssays**, n. 15, p. 469–476, 1993.

KOGAN, M.; TURNIPSEED, S. G.; SHEPARD, M. Pilot insect pest management program for soybean in southern. **Brazilian Journal of Economic Entomology**, n. 70, p. 659–663, 1976.

KOZIEL, M. G.; BELAND, G. L.; BOWMAN, C.; CAROZZI, N. B. Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. **Bio/Technology**, n. 11, p. 194–200, 1993.

KUMAR, S.; BIRAH, A.; CHAUDHARY, B.; BURMA, P. K.; GUPTA, G. P.; PENTAL, D. Plant codon optimized *cry* genes of *Bacillus thuringiensis* can be expressed as soluble proteins in *Escherichia coli* BL21 Codon Plus strain as NusA-Cry protein fusions. **Journal of Invertebrate Pathology**, n. 88, p. 83-86, 2005.

LI J.; CARROLL J.; ELLAR D.J. Crystal structure of insecticidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. **Nature**, n. 353, p. 815-821, 1991.

MARROQUIN, L. D.; ELYASSNIA D.; GRIFFITS J. S.; FEITELSON J. S.; AROIAN R. V. *Bacillus thuringiensis* (Bt) toxin susceptibility and isolation of resistance mutants in the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, n. 155, p. 1693–1699, 2000.

MORSE, R.J.; YAMAMOTO, T.; STROUD, R.M. Structure of Cry2Aa suggests an unexpected receptor binding epitope. **Structure**, n. 9, p. 409–417, 2001.

NAVON, A. *Bacillus thuringiensis* insecticides in crop protection – reality and prospects. **Crop Protection**, n. 19, p. 669-676, 2000.

PEFERÖEN, M. Progress and prospects for field use of *Bt* genes in crops. **Trends in Biotechnology**, n. 15, p. 173-177, 1997.

PERLAK, F. J.; DEATON, R. W.; ARMSTRONG, T. A.; FUCHS, R. L.; SIMS, S. R.; GREENPLATE, J. T.; FISCHHOFF, D. A. Insect resistant cotton plants. **New York Biotechnology Association**, n. 8, p. 939-943, 1990.

PERLAK, F. J.; STONE, T. B.; MUSKOPF, Y. M.; PETERSEN, L. J.; PARKER, G. B.; MCPHERSON, S. A.; WYMAN, J.; LOVE, S.; REED, G.; BIEVER, D. Genetically improved potato protection from damage by Colorado potato beetle. **Plant Molecular Biology**, n. 22, p.313-321, 1993.

PIUBELLI, G. C.; MOSCARDI, F.; HOFFMANN-CAMPO, C. B. Interactions among insect-resistant soybean genotypes extracts with populations of *Anticarsia gemmatilis* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae) susceptible and resistant to its nucleopolyhedrovirus. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, n. 81, p. 4, 2009.

POLANCZYK, R. A.; SILVA, R. F.P.; FIUZA, L. M. Effectiveness of *Bacillus thuringiensis* strains against *Spodoptera fugiperda* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE). **Brazilian Journal of Microbiology**, n. 31, p. 165-167, 2000.

RADNEDGE, L.; AGRON, P. G.; HILL, K.K.; JACKSON, P. J.; TICKNOR, L. O.; KEIM, P.; ANDERSEN, G. L. Genome differences that distinguish *Bacillus anthracis* from *Bacillus cereus* e *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, n. 69, p. 2755-2764, 2003.

RASKO, D. A.; ALTHERR M. R; HAN C. S.; RAVEL J. Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms. **FEMS Microbiology**, n. 29, p. 303–329, 2005.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, n. 4, p. 406–425, 1987.

SCHNEPF, E.; WHITELEY, H. R. Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, n. 78, p. 2893-2897, 1981.

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**, n. 62, p. 775–806, 1998.

SHARMA, H. C.; SHARMA, K. K.; SEETHARAMA, N.; ORTIZ, R. Prospects for using transgenic resistance to insects in crop improvement. **Molecular Biology and Genetics**, n. 3, p. 1-28, 2000.

STEWART, C. N.; ADANG, M. J.; ALL, J. N.; BOERMA, H. R.; CARDINEAU, G.; TUCKER, D.; PARROTT, W. A. Genetic transformation, recovery, and characterization of fertile soybean transgenic for a synthetic *Bacillus thuringiensis cryIAC* gene. **Plant Physiology**, n. 112, p. 121-129, 1996.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, n. 24, p. 4876-4882, 1997.

WALKER, D. R.; ALL, J. N.; MCPHERSON, R. M.; BOERMA, H. R.; PARROTT, W. A. Field evaluation of soybean engineered with a synthetic *cryIAC* transgene for resistance to corn earworm, soybean looper, velvetbean caterpillar (Lepidoptera : Noctuidae), and lesser cornstalk borer (Lepidoptera : Pyralidae). **Journal of Economic Entomology**, n. 93, p. 613-622, 2000.

WARREN, G. W.; CAROZZI, N. B.; DESAI, N.; KOZIEL, M. G. Field evaluation of transgenic tobacco containing a *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein gene. **Journal of Economic Entomology**, n. 5, p. 1651-1659, 1992.

ZHANG, X.; CANDAS, M.; GRIKO, N. B.; ROSE-YOUNG, L.; BULLA, L. A. JR. Cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin depends on specific binding of the toxin to the cadherin receptor BT-R1 expressed in insect cells. **Cell Death and Differentiation**, n. 12, p. 1407–16, 2005.

5.1. Fontes da internet

Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. [http:// www.ctnbio.gov.br](http://www.ctnbio.gov.br) (acesso em 07 de maio de 2010)

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. [http:// www.embrapa.br](http://www.embrapa.br) (acesso em 04 de maio de 2010)

NCBI - National Center for Biotechnology Information. [http:// www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)

USDA – United States Department of Agriculture. [http:// www.usda.gov](http://www.usda.gov) (acesso em 04 de maio de 2010)

6. Apêndice

APÊNDICE 1 - Comparação das sequências de 887 nucleotídeos dos clones 04, 06 e 07 de *CryIA* em pGEM T-Easy. Sequências com *primer* FOR. Asteriscos indicam nucleotídeos idênticos.

```

Cry04      ATGGATAACAATCCGAACATCAATGAATGCATTCCCTTATAATTGTTTAAGTAACCCTGAA
Cry06      ATGGATAACAATCCGAACATCAATGAATGCATTCCCTTATAATTGTTTAAGTAACCCTGAA
Cry07      ATGGATAACAATCCGAACATCAATGAATGCATTCCCTTATAATTGTTTAAGTAACCCTGAA
          *****

Cry04      GTAGAAGTATTAGGTGGAGAAAGAATAGAAACTGGTTACACCCCAATCGATATTTCCCTTG
Cry06      GTAGAAGTATTAGGTGGAGAAAGAATAGAAACTGGTTACACCCCAATCGATATTTCCCTTG
Cry07      GTAGAAGTATTAGGTGGAGAAAGAATAGAAACTGGTTACACCCCAATCGATATTTCCCTTG
          *****

Cry04      TCGCTATCGCAATTTCTTTTGAGTGAATTTGTTCCCGGTGCTGGATTTGTGTTAGGACTA
Cry06      TCGCTAACGCAATTTCTTTTGAGTGAATTTGTTCCCGGTGCTGGATTTGTGTTAGGACTA
Cry07      TCGCTAACGCAATTTCTTTTGAGTGAATTTGTTCCCGGTGCTGGATTTGTGTTAGGACTA
          *****

Cry04      GTTGATATAATATGGGGAATTTTTGGTCCCTCTCAATGGGACGCATTTCTTGTACAAATT
Cry06      GTTGATATAATATGGGGAATTTTTGGTCCCTCTCAATGGGACGCATTTCTTGTACAAATT
Cry07      GTTGATATAATATGGGGAATTTTTGGTCCCTCTCAATGGGACGCATTTCTTGTACAAATT
          *****

Cry04      GAACAGTTAATTAACCAAAGAATAGAAGAATTCGCTAGGAACCAAGCCATTTCTAGATTA
Cry06      GAACAGTTAATTAACCAAAGAATAGAAGAATTCGCTAGGAACCAAGCCATTTCTAGATTA
Cry07      GAACAGTTAATTAACCAAAGAATAGAAGAATTCGCTAGGAACCAAGCCATTTCTAGATTA
          *****

Cry04      GAAGGACTAAGCAATCTTTATCAAATTTACGCAGAATCTTTTAGAGAGTGGGAAGCAGAT
Cry06      GAAGGACTAAGCAATCTTTATCAAATTTACGCAGAATCTTTTAGAGAGTGGGAAGCAGAT
Cry07      GAAGGACTAAGCAATCTTTATCAAATTTACGCAGAATCTTTTAGAGAGTGGGAAGCAGAT
          *****

Cry04      CCTACTAATCCAGCATTAAAGAGAAGAGATGCGTATTCAATTC AATGACATGAACAGTGCC
Cry06      CCTACTAATCCAGCATTAAAGAGAAGAGATGCGTATTCAATTC AATGACATGAACAGTGCC
Cry07      CCTACTAATCCAGCATTAAAGAGAAGAGATGCGTATTCAATTC AATGACATGAACAGTGCC

```

Cry04 CTTACAACCGCTATTCCTCTTTTTGCAGTTCAAATTTATCAAGTTCCTCTTTTATCAGTA
Cry06 CTTACAACCGCTATTCCTCTTTTTGCAGTTCAAATTTATCAAGTTCCTCTTTTATCAGTA
Cry07 CTTACAACCGCTATTCCTCTTTTTGCAGTTCAGAATTATCAAGTTCCTCTTTTATCAGTA

Cry04 TATGTTCAAGCTGCAAATTTACATTTATCAGTTTTGAGAGATGTTTCAGTGTGGACAA
Cry06 TATGTTCAAGCTGCAAATTTACATTTATCAGTTTTGAGAGATGTTTCAGTGTGGACAA
Cry07 TATGTTCAAGCTGCAAATTTACATTTATCAGTTTTGAGAGATGTTTCAGTGTGGACAA

Cry04 AGGTGGGG-ATTTGGTGCCGCGACTATCAATAGTCGTTATAATGATTTAACTAGGCTTAT
Cry06 AGGTGGGGGATTTGATGCCGCGACTATCAATAGTCGTTATAATGATTTAACTAGGCTTAT
Cry07 AGGTGGGG-ATTTGATGCCGCGACTATCAATAGTCGTTATAATGATTTAACTAGGCTTAT

Cry04 TGGCAACTATACAGATTATGCTGTGCGCTGGTACAATACGGGATTAGAGCGTGTATGGGG
Cry06 TGGCAACTATACAGATTATGCTGTGCGCTGGTACAATACGGGATTAGAGCGTGTATGGGG
Cry07 TGGCAACTATACAGATTATGCTGTGCGCTGGTACAATACGGGATTAGAGCGTGTATGGGG

Cry04 ACCGGATTCTAGAGATTGGGTAAGGTATAATCAATTTAGAAGAGAGCTAACACTTACTGT
Cry06 ACCGGATTCTAGAGATTGGGTAAG-TATAATCAATTTAGAAGAGAGCTAACACTTACTGT
Cry07 ACCGGATTCTAGAGATTGGGTAAGGTATAATCAATTTAGAAGAGAGCTAACACTTACTGT

Cry04 ATTAGATATCGTTGCTCTATTCTCAAATTTATGATAGTCGAAGTATCCAATTCGAACAGTT
Cry06 ATTAGATATCGTTGCTCTATTCTCAAATTTATGATAGTCGAAGTATC--ATTCGAA-AGTT
Cry07 ATTAGATATCGTTGCTCTATTCTCAAATTTATGATAGTCGAAGTATCC-ATTCGAACAGTT

Cry04 TCCCA-TTACAAGAGAAATTTATACGACCCAGTATAGAAATTTGATGGTAGTTTTCGTG
Cry06 TCCCA-TTACAGAGG---ATTTATACGACCCAGTATAGAAATTTGATGGTAGTTT-CGTG
Cry07 TCCCAATTAACAAGAGAAATTTATACGACCCAGTATAGAAATTTGATGGTAGTTT-CGTG

Cry04 AATGGC-TCAGAGA-TAGGACAGA-TATTAGGCAACCACATCTTAT
Cry06 AATGGC-TCAGAGA-TAGAACAGAATATTA-----
Cry07 GATGGCCTCAGAGAATAGAACAGAATAT-AGGCACACATCTTATGG

APÊNDICE 2 – Comparação das sequências de 835 nucleotídeos dos clones 04, 06 e 07 de *Cry1A* em pGEM T-Easy. Sequências com *primer* REV. Asteriscos indicam nucleotídeos idênticos.

```

Cry04Rev      AATGCGGGAATGCAGCTCCACCCGCACTG-TCTCAT-AACTGGTTGGGATTTTAGA-CAT
Cry07Rev      -----CAGCTCCACCTGTACTGGTCTCATTAACTGGTTGGGATTTTAGAACAT
Cry06Rev      -GATTCAGAATGCAGCTCCACCCAGAACTGTCTCAT-AACTG-TTGGGATTTTAGA-CAT
                ***** * ***** ***** *****
Cry04Rev      -ATCTCACTTTATATAAGAAGAATATACTGGTCAGGCCCAAATAATCAGGAAGTGTGTGT
Cry07Rev      TATCTCACCTTATATAGAAGAATTATACTTGTTCAGGCC--GATAATCAG-AACTGTT-GT
Cry06Rev      -ATCTCACATTATACAGAAGAATTATACTAGTCAGGCCCAAATAATCAG-TACTGTTTGT
                ***** ***** * * * ***** ***** ***** *****
Cry04Rev      CC-TGATGGAACGGAGTTTC--TTTGCCTCCCTAACGACCAACTTGCCTTCCACTATATA
Cry07Rev      CG-TGATGGAACGGAGTTTTCTTTTGCCTCCCTAACGACCAACTTGCCTTCCACTATATA
Cry06Rev      CCGTGATGAATCGGAGTTTTC-TTTGCCTCCCTAACGACTAACTTACA-TGCACTATATA
                * ***** * ***** ***** ***** * * *****
Cry04Rev      TAGACAAA-GGGGTACAGTCGATTCACTAGATGTAATACCGCCACAGGATAATAGTGTAC
Cry07Rev      TAGACAAAAGGGGTACAGTCGATTCACTAGATGTAATACCGCCACAGGATAATAGTGTAC
Cry06Rev      TAGACAAAAGGGGTACAGTCGATTCACTAGATGTAATACCGCCACAGGATAATAGTGTAC
                ***** *****
Cry04Rev      CACCTCGTGCGGGATTTAGCCATCGATTGAGTCATGTTACAATGCTGAGCCAAGCAGCTG
Cry07Rev      CACG-CGTGCGGGATTTAGCCATCGATTGAGTCATGTTACAATGCTGAGCCAAGCAGCTG
Cry06Rev      -ACGTCGTGCGGGATTTAGCCATCGATTGAGTCATGTTACAATGCTGAGCCAAGCAGCTG
                ** *****
Cry04Rev      GAGCAGTTTACACCTTGAGAGCTCCAACGTTTTCTTGGCAGCATCGCAGTGCTGAATTTA
Cry07Rev      GAGCAGTTTACACCTTGAGAGCTCCAACGTTTTCTTGGCAGCATCGCAGTGCTGAATTTA
Cry06Rev      GAGCAGTTTACACCTTGAGAGCTCCAACGTTTTCTTGGCAGCATCGCAGTGCTGAATTTA
                *****
Cry04Rev      ATAATATAATTCCCTTCATCACAAATTACACAAATACCTTTAACAAAATCTACTAATCTTG
Cry07Rev      ATAATATAATTCCCTTCATCACAAATTACACAAATACCTTTAACAAAATCTACTAATCTTG
Cry06Rev      ATAATATAATTCCCTTCATCACAAATTACACAAATACCTTTAACAAAATCTACTAATCTTG
                *****
Cry04Rev      GCTCTGGAACCTTCTGTTCGTTAAAGGACCAGGATTTACAGGAGGAGATATTCTTCGAAGAA

```

Cry07Rev GCTCTGGAAC TTCTGTCGTTAAAGGACCAGGATTTACAGGAGGAGATATTCTTCGAAGAA
 Cry06Rev GCTCTGGAAC TTCTGTCGTTAAAGGACCAGGATTTACAGGAGGAGATATTCTTCGAAGAA

Cry04Rev CTTACCTGGCCAGATTTCAACCTTAAGAGTAAATATCACTGCACCATTATCACAAAGAT
 Cry07Rev CTTACCTGGCCAGATTTCAACCTTAAGAGTAAATATCACTGCACCATTATCACAAAGAT
 Cry06REV CTTACCTGGCCAGATTTCAACCTTAAGAGTAAATATCACTGCACCATTATCACAAAGAT

Cry04Rev ATCGGGTAAGAATTCGCTACGCTTCTACTACAAATTTACAATTCATACATCAATTGACG
 Cry07Rev ATCGGGTAAGAATTCGCTACGCTTCTACTACAAATTTACAATTCATACATCAATTGACG
 Cry06Rev ATCGGGTAAGAATTCGCTACGCTTCTACTACAAATTTACAATTCATACATCAATTGACG

Cry04Rev GAGGACCTATTAATCAGGGTAATTTTTTCAGCAACTATGAGTAGTGGGAGTAATTTACAGT
 Cry07Rev GAAGACCTATTAATCAGGGTAATTTTTTCAGCAACTATGAGTAGTGGGAGTAATTTACAGT
 Cry06Rev GAAGACCTATTAATCAGGGTAATTTTTTCAGCAACTATGAGTAGTGGGAGTAATTTACAGT
 ** *****

Cry04Rev CCGGAAGCTTTAGGACTGTAGGTTTTACTACTCCGTTTAACTTTTCAAATGGATCAAGTG
 Cry07Rev CCGGAAGCTTTAGGACTGTAGGTTTTACTACTCCGTTTAACTTTTCAAATGGATCAAGTG
 Cry06Rev CCGGAAGCTTTAGGACTGTAGGTTTTACTACTCCGTTTAACTTTTCAAATGGATCAAGTG

Cry04Rev TATTTACGTTAAGTGCTCATGTCTTCAATTCAGGCAATGAAGTTTATATAGATCGAATTG
 Cry07Rev TATTTACGTTAAGTGCTCATGTCTTCAATTCAGGCAATGAAGTTTATATAGATCGAATTG
 Cry06Rev TATTTACGTTAAGTGCTCATGTCTTCAATTCAGGCAATGAAGTTTATATAGATCGAATTG

Cry04Rev AATTTGTTCCGGCAGAAGTAACCTTTGAGGCAGAATATGATTTAGAAAGAGCACAAAAGG
 Cry07Rev AATTTGTTCCGGCAGAAGTAACCTTTGAGGCAGAATATGATTTAGAAAGAGCACAAAAGG
 Cry06Rev AATTTGTTCCGGCAGAAGTAACCTTTGAGGCAGAATATGATTTAGAAAGAGCACAAAAGG

Cry04Rev CGGTGAATGAGCTGTTTACTTCTACCAACCCAGCT
 Cry07Rev CGGTGAATGAGCTGTTTACTTCTACCAATCCAGCT
 Cry06Rev CGGTGAATGAGCTGTTTACTTCTTCCAACCCAGCT

APÊNDICE 3 - Comparação da sequência de 887 nucleotídeos do clone pGEM-Cry-04 com as sequências EU447666 (*CryIac*), AF510713 (*CryIAa*), AF384211 (*CryIAa*) e AY225453 (*CryIac*). Sequências com *primer* FOR. Asteriscos indicam nucleotídeos idênticos. Números acima das sequências se referem à sequência de AF510713.

1

EU447666	ATGGATAACAATCCGAACATCAATGAATGCATTCCTTATAATTGTTTAAGTAACCCTGAA
AF510713	ATGGATAACAATCCGAACATCAATGAATGCATTCCTTATAATTGTTTAAGTAACCCTGAA
AF384211	ATGGATAACAATCCGAACATCAATGAATGCATTCCTTATAATTGTTTAAGTAACCCTGAA
Cry04-FOR	ATGGATAACAATCCGAACATCAATGAATGCATTCCTTATAATTGTTTAAGTAACCCTGAA
AY225453	ATGGATAACAATCCGAACATCAATGAATGCATTCCTTATAATTGTTTAAGTAACCCTGAA

EU447666	GTAGAAGTATTAGGTGGAGAAAGAATAGAAACTGGTTACACCCCAATCGATATTTCTTTG
AF510713	GTAGAAGTATTAGGTGGAGAAAGAATAGAAACTGGTTACACCCCAATCGATATTTCTTTG
AF384211	GTAGAAGTATTAGGTGGAGAAAGAATAGAAACTGGTTACACCCCAATCGATATTTCTTTG
Cry04-FOR	GTAGAAGTATTAGGTGGAGAAAGAATAGAAACTGGTTACACCCCAATCGATATTTCTTTG
AY225453	GTAGAAGTATTAGGTGGAGAAAGAATAGAAACTGGTTACACCCCAATCGATATTTCTTTG

EU447666	TCGCTAACGCAATTTCTTTTGAGTGAATTTGTTCCCGGTGCTGGATTTGTGTTAGGACTA
AF510713	TCGCTAACGCAATTTCTTTTGAGTGAATTTGTTCCCGGTGCTGGATTTGTGTTAGGACTA
AF384211	TCGCTAACGCAATTTCTTTTGAGTGAATTTGTTCCCGGTGCTGGATTTGTGTTAGGACTA
Cry04-FOR	TCGCTAACGCAATTTCTTTTGAGTGAATTTGTTCCCGGTGCTGGATTTGTGTTAGGACTA
AY225453	TCGCTAACGCAATTTCTTTTGAGTGAATTTGTTCCCGGTGCTGGATTTGTGTTAGGACTA

EU447666	GTTGATATAATATGGGGAATTTTGGTCCCTCTCAATGGGACGCATTTCTTGTACAAATT
AF510713	GTTGATATAATATGGGGAATTTTGGTCCCTCTCAATGGGACGCATTTCTTGTACAAATT
AF384211	GTTGATATAATATGGGGAATTTTGGTCCCTCTCAATGGGACGCATTTCTTGTACAAATT
Cry04-FOR	GTTGATATAATATGGGGAATTTTGGTCCCTCTCAATGGGACGCATTTCTTGTACAAATT
AY225453	GTTGATATAATATGGGGAATTTTGGTCCCTCTCAATGGGACGCATTTCTTGTACAAATT

EU447666	GAACAGTTAATTAACCAAAGAATAGAAGAATTCGCTAGGAACCAAGCCATTTCTAGATTA
AF510713	GAACAGTTAATTAACCAAAGAATAGAAGAATTCGCTAGGAACCAAGCCATTTCTAGATTA
AF384211	GAACAGTTAATTAACCAAAGAATAGAAGAATTCGCTAGGAACCAAGCCATTTCTAGATTA
Cry04-FOR	GAACAGTTAATTAACCAAAGAATAGAAGAATTCGCTAGGAACCAAGCCATTTCTAGATTA
AY225453	GAACAGTTAATTAACCAAAGAATAGAAGAATTCGCTAGGAACCAAGCCATTTCTAGATTA

EU447666 GAAGGACTAAGCAATCTTTATCAAATTTACGCAGAATCTTTTAGAGAGTGGGAAGCAGAT
AF510713 GAAGGACTAAGCAATCTTTATCAAATTTACGCAGAATCTTTTAGAGAGTGGGAAGCAGAT
AF384211 GAAGGACTAAGCAATCTTTATCAAATTTACGCAGAATCTTTTAGAGAGTGGGAAGCAGAT
Cry04-FOR GAAGGACTAAGCAATCTTTATCAAATTTACGCAGAATCTTTTAGAGAGTGGGAAGCAGAT
AY225453 GAAGGACTAAGCAATCTTTATCAAATTTACGCAGAATCTTTTAGAGAGTGGGAAGCAGAT

EU447666 CCTACTAATCCAGCATTAAGAGAAGAGATGCGTATTCAATTC AATGACATGAACAGTGCC
AF510713 CCTACTAATCCAGCATTAAGAGAAGAGATGCGTATTCAATTC AATGACATGAACAGTGCC
AF384211 CCTACTAATCCAGCATTAAGAGAAGAGATGCGTATTCAATTC AATGACATGAACAGTGCC
Cry04-FOR CCTACTAATCCAGCATTAAGAGAAGAGATGCGTATTCAATTC AATGACATGAACAGTGCC
AY225453 CCTACTAATCCAGCATTAAGAGAAGAGATGCGTATTCAATTC AATGACATGAACAGTGCC

EU447666 CTTACAACCGCTATTCCTCTTTTGGCAGTTCAA AATTATCAAGTTCCTCTTTTATCAGTA
AF510713 CTTACAACCGCTATTCCTCTTTTGGCAGTTCAA AATTATCAAGTTCCTCTTTTATCAGTA
AF384211 CTTACAACCGCTATTCCTCTTTTGGCAGTTCAA AATTATCAAGTTCCTCTTTTATCAGTA
Cry04-FOR CTTACAACCGCTATTCCTCTTTTGGCAGTTCAA AATTATCAAGTTCCTCTTTTATCAGTA
AY225453 CTTACAACCGCTATTCCTCTTTTGGCAGTTCAA AATTATCAAGTTCCTCTTTTATCAGTA

EU447666 TATGTACAAGCTGCAAATTTACATTTATCAGTTT TGAGAGATGTTTCAGTGTTGGACAA
AF510713 TATGTACAAGCTGCAAATTTACATTTATCAGTTT TGAGAGATGTTTCAGTGTTGGACAA
AF384211 TATGTACAAGCTGCAAATTTACATTTATCAGTTT TGAGAGATGTTTCAGTGTTGGACAA
Cry04-FOR TATGTACAAGCTGCAAATTTACATTTATCAGTTT TGAGAGATGTTTCAGTGTTGGACAA
AY225453 TATGTACAAGCTGCAAATTTACATTTATCAGTTT TGAGAGATGTTTCAGTGTTGGACAA

EU447666 AGGTGGGGATTTGATGCCGCGACTATCAATAGTC GTTATAATGATTTAACTAGGCTTATT
AF510713 AGGTGGGGATTTGATGCCGCGACTATCAATAGTC GTTATAATGATTTAACTAGGCTTATT
AF384211 AGGTGGGGATTTGATGCCGCGACTATCAATAGTC GTTATAATGATTTAACTAGGCTTATT
Cry04-FOR AGGTGGGGATTTGATGCCGCGACTATCAATAGTC GTTATAATGATTTAACTAGGCTTATT
AY225453 AGGTGGGGATTTGATGCCGCGACTATCAATAGTC GTTATAATGATTTAACTAGGCTTATT

EU447666 GGCAACTATACAGATTATGCTGTGCGCTGGTACA ATACGGGATTAGAGCGTGTATGGGGA
AF510713 GGCAACTATACAGATTATGCTGTGCGCTGGTACA ATACGGGATTAGAGCGTGTATGGGGA
AF384211 GGCAACTATACAGATTATGCTGTGCGCTGGTACA ATACGGGATTAGAGCGTGTATGGGGA
Cry04-FOR GGCAACTATACAGATTATGCTGTGCGCTGGTACA ATACGGGATTAGAGCGTGTATGGGGA
AY225453 GGCAACTATACAGATTATGCTGTGCGCTGGTACA ATACGGGATTAGAGCGTGTATGGGGA

```

EU447666      CCGGATTCTAGAGATTGGGTAAGGTATAATCAATTTAGAAGAGAGCTAACACTTACTGTA
AF510713     CCGGATTCTAGAGATTGGGTAAGGTATAATCAATTTAGAAGAGAGCTAACACTTACTGTA
AF384211     CCGGATTCTAGAGATTGGGTAAGGTATAATCAATTTAGAAGAGAGCTAACACTTACTGTA
Cry04-FOR    CCGGATTCTAGAGATTGGGTAAGGTATAATCAATTTAGAAGAGAGCTAACACTTACTGTA
AY225453     CCGGATTCTAGAGATTGGGTAAGGTATAATCAATTTAGAAGAGAATTAACACTAACTGTA
*****
EU447666     TTAGATATCGTTGCTCTATTCTCAAATTATGATAGTCTGAAGGTATCCAATTCGAACAGTT
AF510713     TTAGATATCGTTGCTCTATTCTCAAATTATGATAGTCTGAAGGTATCCAATTCGAACAGTT
AF384211     TTAGATATCGTTGCTCTATTCTCAAATTATGATAGTCTGAAGGTATCCAATTCGAACAGTT
Cry04-FOR    TTAGATATCGTTGCTCTATTCTCAAATTATGATAGTCTGAAGGTATCCAATTCGAACAGTT
AY225453     TTAGATATCGTTGCTCTGTTCCCGAATTATGATAGTAGAAGATATCCAATTCGAACAGTT
*****
EU447666     TCCCAATTAACAAGAGAAATTTATACGAACCCAGTATTAGAAAATTTTGATGGTAGTTTT
AF510713     TCCCAATTAACAAGAGAAATTTATACGAACCCAGTATTAGAAAATTTTGATGGTAGTTTT
AF384211     TCCCAATTAACAAGAGAAATTTATACGAACCCAGTATTAGAAAATTTTGATGGTAGTTTT
Cry04-FOR    TCCCAATTAACAAGAGAAATTTATACGAACCCAGTATTAGAAAATTTTGATGGTAGTTTT
AY225453     TCCCAATTAACAAGAGAAATTTATACAAACCCAGTATTAGAAAATTTTGATGGTAGTTTT
*****
                                                    890
EU447666     CGTGGAATGGCTCAGAGAATAGAACAGAATATTAGGCAACCACATCTTAT
AF510713     CGTGGAATGGCTCAGAGAATAGAACAGAATATTAGGCAACCACATCTTAT
AF384211     CGTGGAATGGCTCAGAGAATAGAACAGAATATTAGGCAACCACATCTTAT
Cry04-FOR    CGTGAAATGGCTCAGAGA--TATACAGA-TATTAGGCAACCACATCTTAT
AY225453     CGAGGCTCGGCTCAGGGCATAGAAAGAAGTATTAGGAGTCCACATTTGAT
* *          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

APÊNDICE 4 - Comparação da sequência de 835 nucleotídeos do clone pGEM-Cry-04 com as sequências EU447666 (*CryIac*), AF510713 (*CryIAa*), AF384211 (*CryIAa*) e AY225453 (*CryIac*). Sequências com *primer* REV. Asteriscos indicam nucleotídeos idênticos. Números acima das sequências se referem à sequência de AF510713.

1018

```

Cry04Rev      ATGCGGG-AATGCAGCTCCACCCGCTTGTCT--TCATTAAGTGGTTTGGGG-ATTTTTTA
AF510713     ATGCGGGGAATGCAGCTCCACCCGCTTGTCT--TCATTAAGTGGTTTGGGG-ATTTTTTA
EU447666     ATGCGGGGAATGCAGCTCCACCCGCTTGTCT--TCATTAAGTGGTTTGGGG-ATTTTTTA
AF384211     ATGCGGGGAATGCAGCTCCACCCGCTTGTCT--TCATTAAGTGGTTTGGGG-ATTTTTTA

```


AF384211 GCAGTGCTGAATTTAATAATATAAATTCCTTCATCACAAATTACACAAATACCTTTAACAA
 AY225453 GTAGTGCTGAATTTAATAATATAAATTCATCGGATAGTATTACTCAAATCCCTGCAGTGA
 * ***** * ** ***** ***** * * *

Cry04Rev AATCTACTAATCTTGGCTCTGGAACCTTCTGTCGTTAAAGGACCAGGATTTACAGGAGGAG
 AF510713 AATCTACTAATCTTGGCTCTGGAACCTTCTGTCGTTAAAGGACCAGGATTTACAGGAGGAG
 EU447666 AATCTACTAATCTTGGCTCTGGAACCTTCTGTCGTTAAAGGACCAGGATTTACAGGAGGAG
 AF384211 AATCTACTAATCTTGGCTCTGGAACCTTCTGTCGTTAAAGGACCAGGATTTACAGGAGGAG
 AY225453 AG---GGAAACTTTCTTTTAAATGGTTCGTAAATTTACAGGACCAGGATTTACTGGTGGGG
 * ** ** * * ***** ** ***** ***** ** ** *

Cry04Rev ATATTCTTCGAAGAACTTCACCTGGCCAGAT--TTCAACCTTAAGAGTAAATA-----
 AF510713 ATATTCTTCGAAGAACTTCACCTGGCCAGAT--TTCAACCTTAAGAGTAAATA-----
 EU447666 ATATTCTTCGAAGAACTTCACCTGGCCAGAT--TTCAACCTTAAGAGTAAATA-----
 AF384211 ATATTCTTCGAAGAACTTCACCTGGCCAGAT--TTCAACCTTAAGAGTAAATA-----
 AY225453 ACTTAGTTAGATTAATAGTAGTGGAATAACATTCAGAATAGAGGGTATATTGAAGTTC
 * * ** ** ** * *** * * **** * ** ** ** *

Cry04Rev ----TCACTGC--ACCATTATCACAAAGATATCGGGTAAGAATTCGCTACGCTTCTACTA
 AF510713 ----TTACTGC--ACCATTATCACAAAGATATCGGGTAAGAATTCGCTACGCTTCTACTA
 EU447666 ----TTACTGC--ACCATTATCACAAAGATATCGGGTAAGAATTCGCTACGCTTCTACTA
 AF384211 ----TTACTGC--ACCATTATCACAAAGATATCGGGTAAGAATTCGCTACGCTTCTACTA
 AY225453 CAATTCACTTCCCATCGACATCTACCAGATATCGAGTTCGTGTACGGTATGCTTCTGTAA
 * *** * * * *** ***** ** * * ** ** ***** *

Cry04Rev CAAATTTACAATTCATACATCAATTGACGGAGG--ACCTATTAATCAGGGTAATTTTTTC
 AF510713 CAAATTTACAATTCATACATCAATTGACGGAAG--ACCTATTAATCAGGGTAATTTTTTC
 EU447666 CAAATTTACAATTCATACATCAATTGACGGAAG--ACCTATTAATCAGGGTAATTTTTTC
 AF384211 CAAATTTACAATTCATACATCAATTGACGGAAG--ACCTATTAATCAGGGTAATTTTTTC
 AY225453 CCCCATTACCTCAA--CGTTAATTTGGGGTAATTCATCCATTTTTTCCAATACAGTACC
 * * ** ** * * * ***** * * * * ** * ** * * *

Cry04Rev AGCAACTATGA-GTAGTGGGAGTAATTTACAGTCCGGAAGCTTTAGGACTGTAGGTTTTA
 AF510713 AGCAACTATGA-GTAGTGGGAGTAATTTACAGTCCGGAAGCTTTAGGACTGTAGGTTTTA
 EU447666 AGCAACTATGA-GTAGTGGGAGTAATTTACAGTCCGGAAGCTTTAGGACTGTAGGTTTTA
 AF384211 AGCAACTATGA-GTAGTGGGAGTAATTTACAGTCCGGAAGCTTTAGGACTGTAGGTTTTA
 AY225453 AGCTACAGCTACGTCATTAGA-TAATCTACAATCAAGTGATTTTGGTTATTTTGAAGTG
 *** ** * ** * ** ***** ** * ** * * ** * * *

Cry04Rev CTACTCCGTTTAACTTTTCAAATGGATCAAGTGTATTTACGTTAAGTGCTCATGTCTTCA
 AF510713 CTACTCCGTTTAACTTTTCAAATGGATCAAGTGTATTTACGTTAAGTGCTCATGTCTTCA

```

EU447666      CTACTCCGTTTAACTTTTCAAATGGATCAAGTGTATTTACGTTAAGTGCTCATGTCTTCA
AF384211     CTACTCCGTTTAACTTTTCAAATGGATCAAGTGTATTTACGTTAAGTGCTCATGTCTTCA
AY225453     CCAATGCTTTTACATCTTCA-----TTAGGTA---ATATAGTAGGTGTTAGAAATTTTA
              * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Cry04Rev     ATTCAGGCAATGAAGTTTATATAGATCGAATTGAATTTGTTCCGGCAGAAGTAACCTTTG
AF510713     ATTCAGGCAATGAAGTTTATATAGATCGAATTGAATTTGTTCCGGCAGAAGTAACCTTTG
EU447666     ATTCAGGCAATGAAGTTTATATAGATCGAATTGAATTTGTTCCGGCAGAAGTAACCTTTG
AF384211     ATTCAGGCAATGAAGTTTATATAGATCGAATTGAATTTGTTCCGGCAGAAGTAACCTTTG
AY225453     GTGGGACTGCAGGAGTGATAATAGACAGATTTGAATTTATTCCAGTTACTGCAACACTCG
              *           * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
                                     1860
Cry04Rev     AGGCAGAAATATGATTTAGAAAGAGCACAA
AF510713     AGGCAGAAATATGATTTAGAAAGAGCACAA
EU447666     AGGCAGAAATATGATTTAGAAAGAGCACAA
AF384211     AGGCAGAAATATGATTTAGAAAGAGCACAA
AY225453     AGGCTGAATATAATCTGGAAAGAGCGCAG
              **** * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

APÊNDICE 5 - Comparação da sequência de aminoácidos derivada da sequência de nucleotídeos do clone pGEM-Cry 04 For com as sequências EU447666 (Cry1Ac), AF510713 (Cry1Aa), AF384211 (Cry1Aa) e AY225453 (Cry1Ac). Asteriscos indicam aminoácidos idênticos e dois pontos (:) indicam aminoácidos similares. Números acima das sequências se referem à sequência de AF510713.

```

1
AY225453      MDNNPNINECIPYNCLSNPEVEVLGGERIETGYTPIDISLSLTQFLLSEFVPGAGFVLGL
EU447666     MDNNPNINECIPYNCLSNPEVEVLGGERIETGYTPIDISLSLTQFLLSEFVPGAGFVLGL
AF510713     MDNNPNINECIPYNCLSNPEVEVLGGERIETGYTPIDISLSLTQFLLSEFVPGAGFVLGL
AF384211     MDNNPNINECIPYNCLSNPEVEVLGGERIETGYTPIDISLSLTQFLLSEFVPGAGFVLGL
Cry04-FOR    MDNNPNINECIPYNCLSNPEVEVLGGERIETGYTPIDISLSLSQFLLSEFVPGAGFVLGL
              *****:*****
AY225453      VDIIWGIFGPSQWDAFLVQIEQLINQRIEEFARNQAI SRLEGLSNLYQIYAESFREWEAD
EU447666     VDIIWGIFGPSQWDAFLVQIEQLINQRIEEFARNQAI SRLEGLSNLYQIYAESFREWEAD
AF510713     VDIIWGIFGPSQWDAFLVQIEQLINQRIEEFARNQAI SRLEGLSNLYQIYAESFREWEAD
AF384211     VDIIWGIFGPSQWDAFLVQIEQLINQRIEEFARNQAI SRLEGLSNLYQIYAESFREWEAD
Cry04-FOR    VDIIWGIFGPSQWDAFLVQIEQLINQRIEEFARNQAI SRLEGLSNLYQIYAESFREWEAD
              *****
AY225453      PTNPALREEMRIQFNDMNSALTTAIPLFAVQNYQVPLLSVYVQAANLHLSVLRDVSVFGQ

```

```

EU447666      PTNPALREEMRIQFNDMNSALTTAIPLLAVQNYQVPLLSVYVQAANLHLSVLRDVSVFGQ
AF510713     PTNPALREEMRIQFNDMNSALTTAIPLFAVQNYQVPLLSVYVQAANLHLSVLRDVSVFGQ
AF384211     PTNPALREEMRIQFNDMNSALTTAIPLFAVQNYQVPLLSVYVQAANLHLSVLRDVSVFGQ
Cry04-FOR    PTNPALREEMRIQFNDMNSALTTAIPLFAVQNYQVPLLSVYVQAANLHLSVLRDVSVFGQ
*****:*****

AY225453     RWGFDAATINSRYNDLTRLIGNYTDYAVRWYNTGLERVWGPDSRDWVRYNQFRRELTTLV
EU447666     RWGFDAATINSRYNDLTRLIGNYTDYAVRWYNTGLERVWGPDSRDWVRYNQFRRELTTLV
AF510713     RWGFDAATINSRYNDLTRLIGNYTDYAVRWYNTGLERVWGPDSRDWVRYNQFRRELTTLV
AF384211     RWGFDAATINSRYNDLTRLIGNYTDYAVRWYNTGLERVWGPDSRDWVRYNQFRRELTTLV
Cry04-FOR    RWGFGAATINSRYNDLTRLIGNYTDYAVRWYNTGLERVWGPDSRDWVRYNQFRRELTTLV
****.*****

                                                    296

AY225453     LDIVALFPNYDSRRYPPIRTVSQLTREIYTNPVLENFDGSGFRGSAQGIERSIRSPHL
EU447666     LDIVALFSNYDSRRYPPIRTVSQLTREIYTNPVLENFDGSGFRGMAQRIEQNIRQPHL
AF510713     LDIVALFSNYDSRRYPPIRTVSQLTREIYTNPVLENFDGSGFRGMAQRIEQNIRQPHL
AF384211     LDIVALFSNYDSRRYPPIRTVSQLTREIYTNPVLENFDGSGFRGMAQRIEQNIRQPHL
Cry04-FOR    LDIVALFSNYDSRKYPPIRTVSQLTREIYTNPVLENFDGSGFREMAQRYTD-IRQPHL
*****.*****:***** **      **.*

```

APÊNDICE 6 - Comparação da sequência de aminoácidos derivada da sequência de nucleotídeos do clone pGEM-Cry 04 Rev com as sequências EU447666 (Cry1Ac), AF510713 (Cry1Aa), AF384211 (Cry1Aa) e AY225453 (Cry1Ac). Asteriscos indicam aminoácidos idênticos e dois pontos (:) indicam aminoácidos similares. Números acima das sequências se referem à sequência de AF510713.

340

```

EU447666      AGNAAPP-VLVSLTGLGIFRTLSSPLYRRIILGSGPNNQELFVLDGTEFSFASLTTLNLP
AF384211     AGNAAPP-VLVSLTGLGIFRTLSSPLYRRIILGSGPNNQELFVLDGTEFSFASLTTLNLP
AF510713     AGNAAPP-VLVSLTGLGIFRTLSSPLYRRIILGSGPNNQELFVLDGTEFSFASLTTLNLP
cry04        CGNAAPP-ALVSLTGLGIFRHHIS--LYIRRIYWSGPNNQELFVLDGTEFSFASLTTLNLP
AY225453     MGNAAPQQRIVAQLGQGVYRTLSTLYRRPFN-IGINNQQLSVLDGTEFAYG-TSSNLP
***** :*: * *:*:* * * * : * **:* *****:.. :*****

EU447666     TIYRQRGTVDSDLVIPPQDNSVPPRAGFSHRLSHVTMLSQAAG--AVYTLRAPTFSWQHR
AF384211     TIYRQRGTVDSDLVIPPQDNSVPPRAGFSHRLSHVTMLSQAAG--AVYTLRAPTFSWQHR
AF510713     TIYRQRGTVDSDLVIPPQDNSVPPRAGFSHRLSHVTMLSQAAG--AVYTLRAPTFSWQHR
cry04        TIYRQRGTVDSDLVIPPQDNSVPPRAGFSHRLSHVTMLSQAAG--AVYTLRAPTFSWQHR
AY225453     AVYRKSGTVDSLDEIPPQNNVPPRQGFHRLSHVSMFRSGFSNSSVSIIRAPMFSWIHR
::**:* ***** ***:*.**** *****:*: .. . :* :*** ** **

```

```

EU447666      SAEFNNIIPSSQITQIPLTKSTNLGSGTSVVKGPGFTGGDILRRTSPGQISTLRVNITAP
AF384211     SAEFNNIIPSSQITQIPLTKSTNLGSGTSVVKGPGFTGGDILRRTSPGQISTLRVNITAP
AF510713     SAEFNNIIPSSQITQIPLTKSTNLGSGTSVVKGPGFTGGDILRRTSPGQISTLRVNITAP
cry04        SAEFNNIIPSSQITQIPLTKSTNLGSGTSVVKGPGFTGGDILRRTSPGQISTLRVNITAP
AY225453     SAEFNNIASDSITQIPAVKGNFLFNG-SVISGPGFTGGDLVRLNSSGNNIQNRGYIEVP
*****.*..*****.*..*.***:.*****:.*.*:.*.*

```



```

EU447666      L-----SQRYRVRIRYASTTNLQFHTSIDGRPINQGNFSATMSSGSNLQSGSFRTVGFTT
AF384211     L-----SQRYRVRIRYASTTNLQFHTSIDGRPINQGNFSATMSSGSNLQSGSFRTVGFTT
AF510713     L-----SQRYRVRIRYASTTNLQFHTSIDGRPINQGNFSATMSSGSNLQSGSFRTVGFTT
cry04        L-----SQRYRVRIRYASTTNLQFHTSIDGGPINQGNFSATMSSGSNLQSGSFRTVGFTT
AY225453     IHFPSTSTRYRVRVRYASVTPIHILNVNWNSSIFSNTVPATATSLDNLQSSDFGYFESAN
:          * *****:*****.* ::::.. .. .* .....** :* .*****.* . :.

```

620

```

EU447666      PFNFSNGSSVFTLSAHVFNSGNEVYIDRIEFVPAEVTFEAEYDLERAQ
AF384211     PFNFSNGSSVFTLSAHVFNSGNEVYIDRIEFVPAEVTFEAEYDLERAQ
AF510713     PFNFSNGSSVFTLSAHVFNSGNEVYIDRIEFVPAEVTFEAEYDLERAQ
cry04        PFNFSNGSSVFTLSAHVFNSGNEVYIDRIEFVPAEVTFEAEYDLERAQ
AY225453     AFTSSLGN---IVGVRNFSGTAGVIIDRFEFIPVTATLEAEYNLERAQ
.*.*.*. :...: *.. * **:*:*.*.*:*****:*****

```

APÊNDICE 7 - Árvores filogenéticas obtidas pelo método UPGMA usando em (A) a sequência de aminoácidos correspondente à porção 5' e em (B) a sequência de aminoácidos correspondente à porção 3' do fragmento isolado da linhagem *Bt* UNI498 e diversas sequências de proteínas Cry1A disponíveis no GenBank. O número de acesso e a subfamília de cada proteína Cry estão indicados.

