

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA EM ISOLADOS DE  
*Bacillus thuringiensis* POR PCR TEMPO REAL VISANDO  
O CONTROLE DE *Spodoptera frugiperda* (J.E.SMITH)  
(LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) DE DIFERENTES  
POPULAÇÕES BRASILEIRAS.**

**Camila Chiaradia Davolos**  
Engenheira Agrônoma

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL  
2003

## **DADOS CURRICULARES DA AUTORA**

**CAMILA CHIARADIA DAVOLOS** – nascida em Araras - SP, em 17 de julho de 1982. Ingressou em fevereiro de 2002 na Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” (UNESP) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal - onde, em janeiro de 2007, recebeu o título de Engenheira Agrônoma. Foi bolsista de Iniciação Científica (FAPESP) durante o ano de 2006. Em março de 2007 ingressou no curso de mestrado em Microbiologia Agropecuária na mesma instituição.

“Não são mais aptos nem mais inteligentes os que sobrevivem, senão os que se adaptam melhor as mudanças”

**Charles Darwin**

“Nunca se ressinta do sucesso de outro homem. Lembre-se: cada um de nós vive o seu próprio destino. Nossas vidas correm todas em vias paralelas – o sucesso dos outros não nos puxa para baixo e seu fracasso não nos empurra para cima. Concentre-se no seu próprio trabalho”

**Thrity Umrigar**

“Tudo é uma questão de manter a mente quieta, a espinha ereta e o coração tranquilo”

**Walter Franco**

Aos meus avôs maternos, vó **Lela** e vô **Zezé** (*in memorian*) e paternos, vó **Vinha** e vô **Kinho** (*in memorian*) pelo exemplo de vida e pela certeza de que sempre me olham e me guiam.

Aos meus amados pais, **Maria Carolina** e **Luiz Alberto**, que muitas vezes sacrificaram seus sonhos em favor dos filhos. Pelo apoio, amor incondicional e por todas as oportunidades proporcionadas.

Aos meus irmãos **Francisco** e **Laura** pelo companheirismo, carinho e incentivo.

*“Que nosso abraço seja mais forte que o tempo e a morte; que a luz de nossa amizade possa arder para sempre”*

**DEDICO**

Ao amigo e orientador, Prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos que, quando deveria ser apenas professor, foi mestre. Quando deveria ser mestre, foi amigo. E com sua amizade e compreensão incentivou-me a seguir meu caminho.

**OFEREÇO**

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pela presença e proteção constante em minha vida.

Ao co-orientador Prof. Dr. Odair Aparecido Fernandes, pelos ensinamentos, pela disponibilidade e pela estrutura de seu laboratório cedida com muita hospitalidade.

À Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério Sena, por todo apoio na execução dos experimentos e sugestões valiosas.

Ao Prof. Dr. José Carlos Barbosa pela execução e ajuda na interpretação de todos os dados das análises estatísticas realizadas no trabalho.

Aos membros da banca, Prof. Dr. Celso Omoto e Prof. Dr. Jackson Antonio Marcondes de Souza pelas contribuições valiosas deste trabalho.

À Eliane Cristina da Cunha Alves (Li), pela amizade, pelos ensinamentos pessoais e técnicos e por sempre estar à disposição para auxiliar nos experimentos, me incentivando diariamente.

À grande amiga Ana Maria Guidelli Thuler, desde o início ao meu lado, pelas sugestões, auxílios e incentivos na condução dos experimentos. Pela amizade sincera e por sempre estar pronta a ouvir. Ao seu marido, Robson Tomás Thuler, pela amizade construída durante este tempo.

À amiga Paula Brunini Crialesi, pela agradável convivência, pelas disciplinas cursadas, pelo apoio experimental e por me acolher como se fosse de sua família.

Ao André Ballerini Horta (Churrasqueiro), estagiário e amigo, que me ajudou nas etapas experimentais e que, com certeza, fez muitos dias se tornarem mais divertidos.

À Juliana Regina Rossi, por todo apoio experimental, pela atenção e pela companhia para um “chay”.

À Najara da Silva, pela ajuda na parte inicial deste trabalho, pelas noites que passamos realizando alinhamentos e pelo convívio em uma fase importante de minha vida.

Aos integrantes do Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada: Ana Paula, Ana Rita, Camila, Deise, Emeline, Fernanda, Gabriela, Juliana Costa, Lúcia, Martinha, Meire, Michele, Rebeca, Sandrinha, Selma, Suzana e Viviane, pela convivência e colaboração ao longo do trabalho.

Ao Laboratório de Ecologia Aplicada, na pessoa de Thaís Tanan Oliveira por todo auxílio nas criações de *Spodoptera frugiperda*.

Aos integrantes do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas, em especial aos colegas Wellington e Karla, pelos ensinamentos e auxílio nas análises de PCR Tempo Real.

Aos professores do curso de pós-graduação em Microbiologia Agropecuária, em especial à Profa. Dra. Eliane Gertrudes Macedo Lemos, pela colaboração, incentivo e ensinamentos.

À todos os professores e funcionários da Universidade, em especial aos integrantes do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária, em especial ao Aldo, Ivana e Lucinda, pela agradável amizade, convívio e pela alegria nos serviços prestados.

Aos funcionários da Biblioteca e da Seção de Pós-Graduação do Câmpus, pelas orientações e paciência.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de estudos.

Às amigas de Araras: Cristiane, Lariana, Maria Clara, Maria Cristina (Babi), Maria Eduarda, Renata, Silvia, Vanessa, e às amigas de Graduação: Carolina, Gabriela, Karisa, Lidiane, Manoela e Marina, por me mostrarem ao longo desses anos que: “A distancia nunca foi impedimento para manter viva uma amizade”.

À Carolina Domingues, minha cunhada, pelos momentos de apoio e por todo divertimento que já tivemos juntas.

À Dona Regina, funcionária e amiga, que me acompanha desde 2003, pelos serviços prestados, pela grande amizade construída e pelas risadas incansáveis que nos proporciona.

Aos amigos, Juliana, José Geraldo (Zé), Luciano, Márcio e Paula pela agradável companhia durante o ano que moramos no prédio, pelo dia-a-dia agradável e sempre divertido.

À Heloisa pelas alegres e produtivas aulas de língua espanhola.

Às queridas amigas jaboticabalenses: Heiris, Mariana, Michele, Mônica e Thalita, por me acolherem como amiga de infância e me inserirem no contexto da cidade a qual moro.

Às amigas de república, Giselle e Patrícia pelo convívio agradável de nossa casa e pelas boas risadas. À Giselle pela convivência diária, pela grande amizade, pela companhia nos finais de semana sem nossas famílias e por respeitar meu espaço.

Ao Bruno, Renato (Chacau), Ana Carolina e Fabiana pela companhia e amizade durante esse período.



Ao Caio Dória Guzzo, pela companhia durante o último ano de mestrado, pelos ensinamentos e pela paciência de me fazer entender que: “Quando pensamos sozinhos estamos sempre certos. Quando não, nem sempre”. Muito obrigada!

À família Dória Guzzo, nas pessoas de Paschoal e Cecília pelo carinho, disponibilidade e apoio.

Aos amigos Carla (Caie), Bruno (Bona), Daniel (Disgueio), Gustavo (Bodão) e Rodrigo (Roko) pela convivência e pelos convites para bons churrascos.

À Dra. Eliete, terapeuta, por todas as análises realizadas.

A todos que colocaram ou foram empecilhos em meu caminho, por me darem mais força para lutar e continuar. *“No meio do caminho tinha uma pedra. Tinha uma pedra no meio do caminho...”*

Enfim, a todos os amigos da Universidade e da Cidade de Jaboticabal que, de alguma forma, direta ou indiretamente, contribuíram para minha formação científica e pessoal, meus sinceros agradecimentos.

## SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	2
SUMMARY.....	3
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	4
Referências.....	10
CAPÍTULO 2 – GENES <i>cry1</i> DE <i>Bacillus thuringiensis</i> : IMPLICAÇÕES NA DETERMINAÇÃO DE SUAS ESPECIFICIDADES.	
Resumo.....	14
Introdução.....	14
Material e Métodos.....	16
Resultados.....	18
Discussão.....	24
Conclusões.....	25
Referências.....	25
CAPÍTULO 3 – TESTE DE PATOGENICIDADE DE ISOLADOS DE <i>Bacillus thuringiensis</i> A DUAS POPULAÇÕES DE <i>Spodoptera frugiperda</i> .	
Resumo.....	28
Introdução.....	28
Material e Métodos.....	30
Resultados e Discussão.....	32
Conclusões.....	39
Referências.....	39
CAPÍTULO 4 – ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES <i>cry1Ab</i> e <i>cry1Ac</i> DE <i>B. thuringiensis</i> POR qPCR TEMPO REAL	
Resumo.....	41
Introdução.....	42
Material e Métodos.....	43
Resultados e Discussão.....	49
Conclusões.....	55
Referências.....	57

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA EM ISOLADOS DE *Bacillus thuringiensis* POR PCR TEMPO REAL VISANDO O CONTROLE DE *Spodoptera frugiperda* (J.E.SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) DE DIFERENTES POPULAÇÕES BRASILEIRAS.**

**Resumo** - *Bacillus thuringiensis* é entomopatogênica muito utilizada no controle de insetos-praga e a predição de sua atividade tóxica é realizada por PCR na identificação de genes *cry*. Assim sendo, este trabalho objetivou elaborar novos oligonucleotídeos iniciadores para a detecção das subclasses *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1Ca*, *cry1Ea* e *cry1Fa*, estudar o potencial de controle de 31 isolados de *B. thuringiensis* à duas populações de *Spodoptera frugiperda* por meio de bioensaios e analisar a taxa de expressão dos genes presentes nos isolados por qPCR em tempo real. Um par de oligonucleotídeo iniciador foi elaborado para cada subclasse e dentre os isolados testados 6,5% e 48,5% apresentaram os genes *cry1Ab* e *cry1Ac*, respectivamente, nenhum dos isolados apresentou os genes *cry1Ca*, *cry1Ea* e *cry1Fa*. Dentre os 31 isolados, 13 apresentaram mortalidade acima de 75% para as larvas da população de campo e apenas nove para a população de laboratório, mostrando que os isolados controlaram com maior eficiência as larvas da população de campo. A presença dos genes *cry1Ab* e *cry1Ac* conjuntamente foi associada à elevado potencial de controle às larvas da população de campo e baixo às larvas da população de laboratório. A expressão do gene *cry1Ab*, não foi constatada em nenhum dos isolados nas condições analisadas e, para o gene *cry1Ac*, todos os isolados apresentaram taxa de expressão. Os resultados de expressão foram associados ao potencial de controle das larvas de *S. frugiperda* das populações testadas, sendo que os elevados níveis de expressão do gene *cry1Ac* foram associados diretamente a elevado potencial de controle da população de laboratório.

**Palavras-chave:** controle biológico, qPCR tempo real, lagarta-do-cartucho.

**GENE EXPRESSION ANALYSIS OF *Bacillus thuringiensis* ISOLATES BY REAL TIME PCR TO CONTROL *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) FROM DIFFERENT BRAZILIAN POPULATIONS.**

**Summary** - *Bacillus thuringiensis* is entomopathogenic used for insect control and the prediction of the toxic activity is performed by PCR on the identification of *cry* genes. Thus, the aim of this research was develop news primers for detection the subclasses *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1Ca*, *cry1Ea* and *cry1Fa*, study the potential control of 31 isolates of *B. thuringiensis* against two *Spodoptera frugiperda* populations by bioassays and analyze the rate of gene expression present on the isolates by real-time qPCR. A pair of primer was prepared for each subclass, the genes *cry1Ab* and *cry1Ac* were found in 6.5% and 48.5% of the isolates, respectively, and the genes *cry1Ca*, *cry1Ea* and *cry1Fa* were not detected on the isolates. Among the 31 isolates, 13 showed over 75% mortality for the larvae of field population and only nine isolates to the laboratory population, showing that the isolates controlled more efficiently the larvae of the field population. The presence of *cry1Ab* and *cry1Ac* genes were correlated to high levels of insecticidal activity for the larvae of field population and low levels control to the laboratory population. The expression of *cry1Ab* was not found in any of the isolates analyzed and the rates expression of *cry1Ac* gene was detected in all isolates. The results of gene expression were associated with the potential control to *S. frugiperda*, and the high levels of *cry1Ac* gene expression were linked directly to high levels of insecticidal activity for the laboratory population.

**Keywords:** biological control, real time qPCR, fall armyworm.

## CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

O controle de insetos-praga é um aspecto fundamental na produção agrícola, tanto para grandes como para pequenos produtores. Nos últimos anos, tem sido alto o investimento na otimização de agentes de controle biológico, mas apesar disso, somente alguns bioinseticidas têm sido empregados. Estatísticas mostram que apenas 1% das pragas agrícolas são controladas por compostos originários de organismos vivos. Entretanto, a bactéria *Bacillus thuringiensis* Berliner é responsável por 95% do mercado de bioinseticidas (VALADARES-INGLIS et al., 1998).

Produtos à base de *B. thuringiensis* têm sido utilizados há mais de 50 anos e proporcionam inúmeras vantagens, tais como especificidade ao inseto-alvo, efeito não poluente ao ambiente e inocuidade a mamíferos e vertebrados (MONNERAT & BRAVO, 1999; CÁRDENAS et al., 2001).

Essa bactéria é caracterizada por produzir durante sua fase de esporulação cristais de polipeptídios, denominados proteínas Cry. As proteínas Cry são solubilizadas em condições de pH alcalino no intestino dos insetos e após a conversão das mesmas em proteínas Cry ativas ligam-se a receptores específicos existentes nas células do intestino dos insetos e formam poros que aumentam a permeabilidade da membrana celular. Esse aumento implica em maior absorção de água e tem como consequência a divisão e ruptura celular, seguida de desidratação das células do intestino médio, levando o inseto à morte (LERECLUS et al., 1993).

As linhagens bacterianas da espécie *B. thuringiensis* possuem patogenicidade e especificidade, que são determinadas pelos tipos de genes *cry* funcionais que as mesmas possuem. Atualmente, são descritos mais de 300 sequências de genes *cry*, classificadas com base na homologia de suas sequências de aminoácidos. Essa classificação é composta por quatro estágios hierárquicos em função do local que essas sequências ocupam em uma árvore filogenética (CRICKMORE et al., 2007; DE MAAGD et al., 2001).

No primeiro estágio de classificação as sequências recebem um número e quando essas apresentam menos de 45% de similaridade genética esse número se difere (*cry1*, *cry2*, *cry3*... *cry47*), classificando as sequências em 47 diferentes grupos

de proteínas Cry. Esse número é seguido por uma letra maiúscula que separa as sequências que possuem até 78% de homologia (*cry1A*, *cry1B*, *cry1C*...). Nesta etapa, as sequências são divididas em classes, e quando a homologia entre as sequências passa a ser maior que 95% elas são divididas em um terceiro estágio no qual recebem letras minúsculas (*cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*...), sendo então, classificadas em subclasses. No quarto estágio de classificação as sequências voltam a receber números que representam a ordem de deposição (publicação) das mesmas no banco de dados (*cry1Aa1*, *cry1Aa2* ... *cry1Aa22*) (CRICKMORE et al., 1998).

Dentre as classes existentes para o grupo *cry1*, a classe *cry1A* é composta por 67 sequências gênicas que foram caracterizadas e publicadas entre os anos 1985 e 2006. Essa classe possui nove subclasses, *cry1Aa* a *cry1Ai*, e dentre essas as subclasses com maior número de sequências depositadas são: *cry1Ab* e *cry1Ac*, ambas com 22 sequências.

Outra classe denominada *cry1C*, começou a ser estudada por Honee et al (1988) e apresenta um total de 14 sequências divididas em apenas duas subclasses. No ano de 1990, após a descoberta de uma sequência por um grupo de pesquisadores liderados por Visser, ficou estabelecida a classe *cry1E*: *cry1Ea* com 8 sequências e *cry1Eb* com apenas uma sequência registrada até o momento. Com um número mais restrito de sequências temos também as subclasses *cry1Fa* com duas e a *cry1Fb* com cinco, que compõem a classe *cry1F*.

Com base nessas sequências gênicas, é possível realizar um estudo quanto à variabilidade genética existente entre diferentes isolados de *B. thuringiensis* por meio da técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), idealizada por MULLIS (1990). A identificação dos genes que codificam as toxinas de *B. thuringiensis* por PCR pode auxiliar na predição, mesmo que parcial, da atividade entomopatogênica de cada isolado bacteriano. Sendo assim, essa ferramenta tem se mostrado um método rápido, fácil e muito utilizado na classificação preliminar de isolados bacterianos desta espécie, que são então posteriormente avaliados por bioensaios mais dirigidos às espécies alvo de cada tipo de proteína Cry ativa produzida (PORCAR & PÉREZ, 2003).

O modo de ação das proteínas Cry está sendo amplamente revisto e discutido no cenário mundial. Dentre os trabalhos encontrados podemos verificar que existem

basicamente dois modelos montados para explicar melhor o modo de ação das proteínas Cry.

BRAVO et al. (2007) descrevem um modelo de toxicidade baseado na evolução dos genes *cry*. Os pesquisadores descrevem nesta revisão a função de cada um dos três domínios das proteínas Cry e mostram que o Domínio I da proteína é responsável pela formação do poro no intestino das larvas e inserção da proteína no mesêntelo do intestino das mesmas. Esse domínio apresenta elevada similaridade com outras proteínas oriundas de bactérias formadoras de poros como a colicina Ia, colicina N e com toxinas que atuam em dípteros, confirmando a função do domínio.

O domínio II da proteína está envolvido com a ligação das proteínas em receptores de membrana e sua estrutura é similar a uma série de proteínas que ligam carboidratos, como vitelina, lecitina jacalina e lecitina Mpa. Assim como o domínio II, o domínio III apresenta estruturas similares com outras proteínas de ligação de carboidrato, como a celulose que se liga a 1,4  $\beta$ -glucanase C, galactose oxidase,  $\beta$ -glucuronidase e com domínios de carboidratos que se ligam a xylanase V e  $\beta$ -galactosidase (DE MAAGD et al., 2003). Isso sugere que os carboidratos possuem importante papel na ação dos domínios II e III (BRAVO et al., 1997).

Em um estudo realizado por BRAVO et al. (1997) e DE MAAGD et al. (2001) os autores verificaram por análise filogenética das diferentes famílias dos genes *cry* que os domínios I e II da proteína co-evoluíram de forma semelhante e que a análise do domínio III mostrou-se diferente, pois algumas proteínas trocaram de especificidade e de alvo de atuação, sugerindo que este domínio pode ser o responsável por criar diferentes especificidades às larvas de insetos. Com este estudo pode-se concluir que, com base na evolução dos três domínios das proteínas Cry, a diferença de comportamento evolucionário do domínio III em relação aos domínios I e II, gera proteínas com elevada especificidade quanto ao modo de ação, mas com diferenças muito específicas em sua sequencias gênicas.

Outro modelo de atuação de proteínas Cry foi descrito por ZHANG et al. (2005). Os autores dividem o modelo proposto em dois tipos de interação entre as toxinas Cry e a célula alvo. Um tipo é baseado na montagem das toxinas Cry como oligômeros que se ligam à célula, mas não leva a célula a morte. A ligação formada é não específica,

portanto, não há interação específica entre a toxina e os componentes da membrana de lipídeos.

O segundo tipo de interação é descrita entre as proteínas Cry e o receptor BT-R da caderina. A citotoxicidade ocorre imediatamente após a ligação das toxinas Cry com o receptor BT-R1, que é ativado por íons  $Mg^{2+}$  e são responsáveis por levar as células à morte. Nenhum receptor BT-R1 foi encontrado em vertebrados e isto sugere que este seja um receptor específico de invertebrados, particularmente de insetos (ZHANG et al., 2005).

Os dois modelos acima citados são de extrema relevância para o estudo da suscetibilidade de larvas em relação às proteínas Cry. Neste contexto, pesquisadores buscam caracterizar novos isolados de *B. thuringiensis* quanto ao potencial entomopatogênico de pragas, bem como estudar as interações de suas toxinas ao epitélio intestinal das larvas, podendo assim realizar um manejo de pragas mais eficiente.

Dentre as pragas estudadas, a lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH, 1797), destaca-se por ser uma praga de grande importância econômica para diferentes culturas como, algodão, milho, tomate, soja. Na cultura do milho (*Zea mays* L.), pode causar reduções superiores a 30% na produtividade (CRUZ, 1995). Essa praga é normalmente controlada com inseticidas químicos pertencentes aos grupos químicos dos fosforados, clorofosforados, carbamatos e piretróides e principalmente com ingredientes ativos como carbaril, metomil (carbamatos) e cipermetrina (piretróides) (HILL, 1993). A utilização abusiva desses inseticidas vem trazendo problemas como o elevado espectro de ação, até o seu acúmulo no meio ambiente ocasionando sérios problemas de poluição (Pfeifer & Grigeiatti, 1996).

Para contornar esse tipo de problema, microorganismos entomopatogênicos podem ser empregados no controle de *S. frugiperda*. Dentro do contexto do controle biológico com a bactéria *B. thuringiensis* são conhecidos alguns genes de maior efetividade no controle da praga *S. frugiperda*, entre eles os genes *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1Ca*, *cry1Ea* e *cry1Fa*.

A toxina inseticida Cry1Ca formou poros nas membranas das vilosidades de *S. frugiperda* (LORENCE et al., 1995). Já LOGUERCIO et al. (2001), com a realização de



bioensaios contra larvas de *S. frugiperda*, observou que a presença do gene *cry1Ca* foi associada tanto à alta quanto à baixa mortalidade das larvas e que a presença do gene *cry1E* estava correlacionada com elevado índice de mortalidade, o gene *cry1F* não foi detectado nos isolados em estudo.

Em um estudo realizado na Colômbia, ARANGO et al. (2002) atribuíram a alta eficiência no controle de *S. frugiperda* à presença do gene *cry1Ca* nos isolados de *B. thuringiensis*. CHILCOTT & WIGLEY (1993) e LUO et al. (1999) encontraram isolados produzindo proteínas Cry1C ou Cry1F, com potencial tóxico para *S. exigua*. Este resultado foi contestado por HERNANDÉZ et al. (2004) que constataram que os genes *cry1Ab*, *cry1Ac* ou *cry1E* estavam presentes em isolados que proporcionaram maior toxicidade às larvas. Os autores descrevem que a toxicidade dos isolados de *B. thuringiensis* contra *S. frugiperda* pode estar associada tanto à presença de outros genes como suas respectivas intensidades de expressão. Os mesmos afirmam que ainda não é possível inferir quais são os genes que conferem a alta eficiência contra o inseto.

Contudo, é necessária a busca de novas estratégias para determinar o que realmente influencia a mortalidade dos insetos, se é apenas a presença dos genes ou se a mortalidade está associada com a intensidade da expressão gênica. Nesse sentido, a técnica PCR tempo real mostra-se bastante interessante, pois possibilita o monitoramento da quantificação de maneira precisa dos ácidos nucléico DNA e RNA a cada ciclo e apresenta elevada reprodutibilidade, determinando valores durante a fase exponencial das reações.

Para a realização de PCR tempo real é necessário que se tenha um termociclador com sistema ótico e um computador acoplado ao mesmo com um software específico para a aquisição de dados e análise final dos resultados. Na reação de PCR tempo real é necessário que se utilize fluoróforos especiais (*TaqMan*, *SYBRgreen*, *LUX*) e iniciadores montados em programas específicos de PCR tempo real. Além disso, o procedimento de otimização dos iniciadores são diferentes.

No momento da amplificação por PCR tempo real com o fluoróforo *TaqMan*®, o par de iniciadores específicos é complementado com uma sonda, a qual é elaborada para se parear no meio da sequência alvo e, portanto se associando intensamente com

a região em que os pares de iniciadores atuam. Esta sonda deverá conter também dois compostos especiais, um fluorescente e outro denominado “quencher”. No processo de amplificação a sonda *TaqMan*® é degradada devido a atividade exonuclease (5' - 3') da *Taq* DNA polimerase e, como consequência, ocorre a separação entre o “quencher” e o composto fluorescente, permitindo um aumento da intensidade fluorescente; sendo assim o processo de emissão de luz é aumentado de forma exponencial (YANG et al. 2005).

Um ponto crucial para a realização de amplificação por PCR tempo real é a determinação do valor Ct (cycle threshold). Esse valor representa o número de ciclos de amplificação necessários para que as amostras atinjam uma concentração que seja detectada pelo aparelho; portanto cada amostra utilizada terá o seu valor Ct (WILHELM et al. 2003; MOHAMMADI & DAY 2004).

Outra característica indispensável para se obter eficiência no uso da técnica PCR tempo real e para validar os resultados obtidos é a escolha de um controle interno, ou mais comumente denominado controle endógeno. Esse controle deve ser escolhido com base na expressão gênica relacionada com a do material que esta sendo avaliado para servir como elemento de comparação e validação dos resultados obtidos (REVILLA-FERNÁNDEZ et al. 2005; YANG et al. 2005).

Neste sentido, a determinação da especificidade das sequências dos genes *cry1* torna-se imprescindível para o estudo da interação toxina – inseto. A taxa da expressão destes genes por PCR tempo real poderá estar associada ao controle de *S. frugiperda*, devido ao fato de que as proteínas podem estar competindo pelo mesmo receptor de membrana, ou então, estarem agindo sinergisticamente.

Este trabalho objetivou analisar as sequências dos genes de *B. thuringiensis* *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1Ca*, *cry1Ea* e *cry1Fa* para montagem de novos oligonucleotídeos iniciadores específicos. Avaliar a atividade biológica de isolados de *B. thuringiensis* à larvas de *S. frugiperda* de diferentes populações brasileiras e avaliar a expressão gênica dos gene *cry1Ab* e *cry1Ac* por PCR tempo real. Com objetivo final de associar os níveis de expressão ao potencial de controle de larvas de *S. frugiperda* de diferentes populações.

## REFERÊNCIAS

ARANGO, J.A.; ROMERO, M.; ORDUZ, S. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Colombia with insecticidal activity against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal Applied of Microbiology**. v.92 p. 466-74, 2002.

BRAVO, A. Phylogenetic relationships of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin family proteins and their functional domains. **Journal Bacteriology**. v.179, p.2793-2801, 1997.

BRAVO, A.; GILL, S.S.; SOBERÓN, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potencial for insect control. **Toxins**. v.49, p.423-435, 2007.

CÁRDENAS, M.I.; GALÁN-WONG, L.; FERRÉ-MANZANERO, J.; PEREYRA-ALFÉREZ, B. Selección de toxinas contra *Trichoplusia ni*. **Ciencia Uanl**. v.4, n.01, p.51-62, 2001

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

CRICKMORE, N.; ZEIGLER D. R.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; BRAVO, A.; DEAN D. H. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. [http://www.biols.susx.ac.uk/home/Neil\\_Crickmore/Bt/index.html](http://www.biols.susx.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/index.html). acessado dia 16 de outubro de 2007.

CHILCOTT, C.N.; WIGLEY, P.J. Isolation and toxicity of *Bacillus thuringiensis* from soil insect habitats in New Zealand. **Jounal of Invertebral Pathology**. v.61, p.244-247, 1993.

CRUZ, I. **A lagarta do cartucho na cultura do milho**. Sete lagoas: EMBRAPA/CNPMS, 45p.(EMBRAPA/CNPMS. Circular Técnica, 21), 1995.

DE MAAGD, R.; BRAVO, A.; CRICKMORE, N. How *Bacillus thuringiensis* has involves toxins to colonize the insect world. **Trends Genetic**. v.17, p.193-199, 2001.

DE MAAGD, R.; BRAVO, A.; BERRY, C.; CRICKMORE, N.; SCHNEPF, H.E. Structure, diversity and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. **Annual Review Genetics**. v.37, p.409-433, 2003.

HERNÁNDEZ, C.S.; RODRIGO, A.; FERRÉ, J. Lyophilization of lepidopteran midges: a preserving method for *Bacillus thuringiensis* toxin binding studies. **Journal of Invertebral Pathology**. v.85, p.182-187, 2004.

HILL, D.S. Agricultural Insect pests of the tropics and their control. Cambridge University press. ISBN 0 51 24638 5, 1993.

LERECLUS, D.; DELECLUSE, A.; LECADET, M.M. Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. In: ENTWISTLE, P.F., CORY, J.S., BAILEY, M. J., HIGGS, S. ***Bacillus thuringiensis* an environmental biopesticide: theory and practice**. Chichester: J. Wiley e Sons, p.37-70, 1993.

LOGUERCIO, L.L.; SANTOS, C.G.; BARRETO, M.R.; GUIMARAES, C.T.; PAIVA, E. Association of PCR and feeding bioassays as a large-scale method to screen tropical *Bacillus thuringiensis* isolates for a *cry* constitution with higher insecticidal effect against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. **Letters in Applied Microbiology**. v.32, p.362-367, 2001.

LORENCE A.; DARSZON A.; DIAZ C.; LIEVANO A.; QUINTERO R.; BRAVO A. Delta-endotoxins induce cation channels in *Spodoptera frugiperda* brush border membranes in suspension and in planar lipid bilayers. **FEBS Letters**. v.360, p.217-222, 1995.

LUO, K.; BANKS, D.; ADANG, M.J. Toxicity, binding and permeability analyses of four *Bacillus thuringiensis* Cry1  $\delta$ -endotoxins using brush border membrane vesicles of *Spodoptera exigua* and *Spodoptera frugiperda*. **Applied Environmental Microbiology**. v.65, p.457-464, 1999.

MOHAMMADI, M.; DAY, P.J.R. Oligonucleotides Used as Template Calibrations for General Application in Quantitative Polymerase Chain Reaction. **Analytical Biochemistry**. v.335, p.29-304, 2004.

MONNERAT, R.; BRAVO, A. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. In: Mello, I.S., Azevedo, J.L., **Controle Biológico**. Jaguariúna: EMBRAPA 3, p.163-200. 1999.

MULLIS, KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. **Scientific American**. v.262, p.56-65, 1990.

PORCAR, M.; JUÁREZ-PÉREZ, V. PCR- based identification of *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal genes. **FEMS Microbiology Reviews**, Paris, v.26, p.419-432, 2003.

REVILLA-FERNÁNDEZ, S.; WALLNER, B.; TRUSCHNER, K.; BENCZAK, A.; BREM, G.; SCHMOLL, F.; MUELLER, M.; STEINBORN, R. The Use of Endogenous and Exogenous reference RNAs for Qualitative and Quantitative Detection of PRRSV in Porcine Semen. **Journal of Virological Methods**. v.126, p.21-30, 2005.

VALADARES-INGLIS, M. C. C.; SOUZA, M. T.; SHILER, W. Engenharia genética de microorganismos agentes de controle biológico, In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Controle biológico**. EMBRAPA: Jaguariúna, p. 102-225. 1998.

ZHANG, X.; CANDAS M.; GRIKO, N.B.; ROSE-YOUNG, L.; BULLA-JR, L.A. Cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab depends on specific binding of the toxins to the cadherin receptor BT-R1 expressed in insect cells. **Nature**. v.12, p.1407-1416, 2005.

WILHELM, J.; PINGOUD, A.; MEINHARD, H. Validation of an Algorithm for Automatic Quantification of Nucleic Acid Copy Numbers by Real-Time Polymerase Chain Reaction. **Analytical Biochemistry**. v.317, p.218-225, 2003.

YANG, L.; PAN, A.; ZHANG, K.; GUO, J.; YIN, C.; CHIEN, J.; HUANG, C.; ZHANG, D. Identification and Quantification of Three Genetically Modified Insect Resistant Codon Lines Using Conventional and TaqMan Real-Time Polymerase Chain Reaction Methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.53, p.6222-6229, 2005.

## **CAPÍTULO 2 - “Genes *cry1* de *Bacillus thuringiensis*: implicações na determinação de suas especificidades”**

**RESUMO** - Alguns Programas de Manejo Integrado de Pragas utilizam a identificação de genes *cry1* de *Bacillus thuringiensis* por PCR para a predição da atividade tóxica de isolados desta bactéria. Com a mudança do cenário mundial em relação ao modo de ação das proteínas Cry, os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a detecção destes genes devem ser elaborados de acordo com essas novas abordagens relatadas. Nesse sentido, foi realizado um estudo ‘*in-silico*’ de sequências de genes de cinco subclasses *cry1*, e comprovado por meio de ferramentas moleculares as especificidades dessas sequências. A elaboração de novos oligonucleotídeos iniciadores propôs uma seleção mais exata de isolados de *B. thuringiensis*, podendo então direcionar melhor os programas de controle biológico.

**Palavras-chave:** oligonucleotídeos iniciadores, PCR, sequenciamento, homologia, subclasses *cry1*, proteínas Cry.

### **INTRODUÇÃO**

A atividade tóxica das proteínas Cry da bactéria *B. thuringiensis* está ligada a três domínios conservados (WU et al. 2007) e, atualmente, o modo de ação dessas proteínas está sendo amplamente revisto e discutido no cenário mundial.

Anteriormente, a toxicidade das proteínas Cry estava associada ao componente N-terminal, enquanto que o componente C-terminal determinava a formação da estrutura do cristal (LI et al. 1991). Com base neste pensamento, os oligonucleotídeos iniciadores utilizados na fase inicial do trabalho para a detecção de genes das subclasses *cry1* por PCR foram elaborados na região do domínio I da proteína, ou seja, no início das sequências de nucleotídeos de cada subclasse. De acordo com o novo modelo de ação das proteínas Cry, tanto a região do domínio II como a do domínio III poderiam ser

selecionadas para a elaboração dos oligonucleotídeos iniciadores, pelo fato desses dois domínios estarem envolvidos no processo de reconhecimento e ligação das proteínas aos receptores de membrana existentes nas microvilosidades do intestino de larvas dos insetos e por serem responsáveis pela especificidade (BRAVO et al. 2007).

No entanto, o domínio II foi selecionado para a elaboração dos oligonucleotídeos iniciadores, pois levou-se em consideração, além do conceito anteriormente citado, o trabalho publicado por DE MAAGD et al. (2001), que descreveram relações filogenéticas presentes nos três diferentes domínios de 79 sequências de subgrupos de genes *cry*. Os autores constataram que os domínios I e II das proteínas Cry co-evoluíram de forma semelhante e que, ao analisar a região do domínio III, diferenças de especificidade e de alvo de atuação foram encontradas para algumas proteínas. Desta forma, o domínio II foi selecionado para a elaboração dos oligonucleotídeos iniciadores deste trabalho, pois na árvore filogenética do trabalho acima relatado, as proteínas da família Cry1 ficaram mais próximas entre si, eliminando a possibilidade de sobreposição dessas sequências com proteínas Cry de outras famílias.

Sendo assim, o presente trabalho teve como principal objetivo estudar sequências de genes das subclasses *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1Ca*, *cry1Ea* e *cry1Fa*, para determinar regiões específicas, sem sobreposição de sequências na região do domínio II. A finalidade deste estudo prévio foi a elaboração de oligonucleotídeos iniciadores que detectem por meio de PCR com exatidão as cinco subclasses acima citadas. Comprovar molecularmente a especificidade desses oligonucleotídeos iniciadores, por meio de PCR, numa coleção de isolados de *B. thuringiensis* positivos para as subclasses dos genes quando submetidos a PCR com oligonucleotídeos elaborados no domínio I da proteína.



## MATERIAL E MÉTODOS

### 1. Linhagens

Foram analisados 31 isolados de *B. thuringiensis*, obtidos de amostras de solos de diferentes locais do Estado de São Paulo, do Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA), junto ao Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária na Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal-SP. Além destes, foram utilizadas seis linhagens padrão: *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD1, var. *aizawai*, var. *tolworthi*, como controles positivos nas reações de amplificação e var. *tenebrionis*, var. *londrina* e var. *san diego*, como controles negativos.

### 2. Sequenciamento e Análise das Sequências

As reações de sequenciamento foram realizadas com o kit “DNA Sequencing-Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready ABI Prism” Versão 3.0. Os fragmentos de PCR oriundos da amplificação com oligonucleotídeos iniciadores elaborados na região do domínio I (Figura 1) foram sequenciados em aparelho automático do tipo ABI 3100 - Applied Biosystems®, em sistema capilar. A qualidade das sequências de DNA geradas foi verificada pelo programa “*Sequencing Analysis 3.4*” (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) que gerou eletroferogramas. As sequências foram submetidas à consulta de similaridade de nucleotídeos no banco de dados do Gene Bank acessado através do NCBI (National Center for Biotechnology Information). O programa utilizado para a consulta foi o *BLASTN* - “Basic Local Alignment Search Tools”. Os alinhamentos foram realizados pelo software *Clustal W* (THOMPSON et al. 1997).

### 3. Extração do DNA genômico

Os isolados foram submetidos à extração de DNA, realizada pelo protocolo descrito por Marmur (1961), com algumas modificações: adição de lisozima ( $20 \text{ mg ml}^{-1}$ ) como adaptação para bactérias Gram-positivas, e uso de solução de TE (10mM TrisHCl, 1mM EDTA - pH 7.4) em substituição à solução salina citrato, visando diminuir a quantidade de sal nas amostras de DNA.

As amostras contendo o DNA genômico de cada isolado foram quantificadas em espectrofotômetro (BECKMAN, modelo DU-640B), e a integridade do DNA foi constatada em gel de agarose a 0,8%, conforme SAMBROOK & RUSSEL (2001).

### 4. Identificação das subclasses da família do gene *cry1* na região do domínio II

A identificação das cinco subclasses dos genes da família *cry1* foram realizadas para os 31 isolados de *B. thuringiensis* positivos para a amplificação com os oligonucleotídeos iniciadores elaborados na região do domínio I. Para tanto as reações de amplificação foram conduzidas em volume de  $20 \mu\text{l}$  contendo: 60 ng de DNA molde,  $250 \mu\text{M}$  de uma solução de dNTPs (10mM); 2,0 mM de  $\text{MgCl}_2$  ;  $0,4 \mu\text{M}$  de cada iniciador; 1,0 U da enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen®); solução tampão para a reação de PCR (1X) e água destilada Milli-Q previamente esterilizada (qsp  $20 \mu\text{l}$ ). As condições para realização das reações de amplificação foram: 5 min a  $95^\circ\text{C}$ , 31 ciclos consistindo de 1 min a  $95^\circ\text{C}$ , temperatura de pareamento por 1 min, 1 min a  $72^\circ\text{C}$  e, um passo extra de extensão a  $72^\circ\text{C}$  por 5 min. A temperatura de pareamento foi específica para cada oligonucleotídeo iniciador, o gene *cry1Ab* teve uma temperatura de  $41^\circ\text{C}$ , *cry1Ac* de  $45^\circ\text{C}$ , *cry1Ca* de  $52^\circ\text{C}$ , *cry1Ea* de  $54^\circ\text{C}$  e *cry1Fa* de  $51^\circ\text{C}$ . Os produtos de amplificação foram analisados em gel de agarose a 1,5%, conforme SAMBROOK & RUSSEL (2001).

## RESULTADOS

### 1. Análise dos genes *cry1* com os oligonucleotídeos elaborados no domínio

I

O sequenciamento dos produtos de PCR dos fragmentos referente à região do domínio I resultou em cinco eletroferogramas diferentes para cada isolado. Todas as sequências obtidas da amplificação com os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para os genes: *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1Ca* e *cry1Fa*, apresentaram alta similaridade com sequências do gene *cry1Ac*. Apenas o par de oligonucleotídeos iniciadores designado para a detecção do gene *cry1Ea* apresentou similaridade entre 94 e 98% com sequências do gene propriamente dito e não apresentou similaridade com nenhuma sequência do gene *cry1Ac* (Tabela 1).

As sequências resultantes do fragmento de amplificação com o par de oligonucleotídeo iniciador referente ao gene *cry1Ab* apresentou homologia de 93% com 21 sequências do gene *cry1Ac*, quando comparadas por *BLAST N* e similaridade de 90% com sequências do gene *cry1Ab* (Tabela 1). As sequências do gene *cry1Ac* apresentaram similaridade de 97% com sequências da mesma subclasse. Os fragmentos de amplificação para o gene *cry1Ca* resultaram em sequências possuindo 99% de identidade com o gene *cry1Ac*. Pode-se verificar identidade de 96% com sequências referentes ao gene *cry1Ab* e identidade de apenas 87% com o gene *cry1Ca* (Tabela 1). As sequências oriundas da amplificação com o par de oligonucleotídeo iniciador para detecção do gene *cry1Fa* também apresentaram identidade com sequências do gene *cry1Ac*, porém em valores menores que variaram de 87 a 89% (Tabela 1). Estes fatos foram observados devido à elevada homologia das sequências de nucleotídeos pertencentes às diferentes classes e subclasses de genes *cry1*.

O alinhamento dos fragmentos de PCR por *Clustal W* revelou elevada percentagem de identidade entre as sequências. Dentre as regiões de amplificação, as pertencentes aos genes *cry1Ab* e *cry1Ac* apresentaram maior percentagem de identidade (Figura 2), mostrando uma área de sobreposição de 351 bases. Esta área se inicia na 1ª base da sequência do gene *cry1Ab* que coincide com a 361ª base da

sequência do gene *cry1Ac* e vai até a 351<sup>a</sup> da região do *cry1Ab*. Nesta região de sobreposição apenas 11 bases diferiram entre si, revelando uma identidade de 96,8%. Além disso, o oligonucleotídeo iniciador forward designado para a detecção do gene *cry1Ab* está totalmente inserido na sequência do gene *cry1Ac* e o mesmo ocorre com o oligonucleotídeo iniciador reverse do gene *cry1Ac* em relação à sequência do *cry1Ab* (regiões destacadas em cinza Figura 2).

**Tabela 1.** Percentagem de Similaridade obtida por análise por *BlastN* entre as cinco subclasses estudadas.

	<i>cry1Ab</i>	<i>cry1Ac</i>	<i>cry1Ca</i>	<i>cry1Ea</i>	<i>cry1Fa</i>
<i>cry1Ab</i>	90%	93%	89%	---	---
<i>cry1Ac</i>	93%	97%	93%	88%	---
<i>cry1Ca</i>	96%	99%	87%	96%	91%
<i>cry1Ea</i>	---	---	---	98%	---
<i>cry1Fa</i>	86%	89%	---	---	---

cr1Ab	-GAGATGTTTCAGTGT	TTGGACAAAGGTGGGGATTGATGCCGCGACTATCAATAGTCGT	59
cry1Ac	AGAGATGTTTCAGTGT	TTGGACAAAGGTGGGGATTGATGCCGCGACTATCAATAGTCGT	420
*****			
cr1Ab	TATAATGATTTAACTAGGCTTATTGGCAACTATACAGATCATGCTGTACGCTGGTACAAT		119
cry1Ac	TATAATGATTTAACTAGGCTTATTGGCAACTATACAGATTATGCTGTACGCTGGTACAAT		480
*****			
cr1Ab	ACGGGATTAGAGCGTGTATGGGGACCGGATTCTAGAGATTGGATAAGATATAATCAATTT		179
cry1Ac	ACGGGATTAGAACGTGTATGGGGACCGGATTCTAGAGATTGGGTAAGGTATAATCAATTT		540
*****			
cr1Ab	AGAAGAGAATTAACACTAACTGTATTAGATATCGTTTCTCTATTTCCGAATATGATAGT		239
cry1Ac	AGAAGAGAATTAACACTAACTGTATTAGATATCGTTGCTCTGTTCCCGAATATGATAGT		600
*****			
cr1Ab	AGAACGTATCCAATTCGAACAGTTTCCAATTAACAAGAGAAATTTATACAAACCCAGTA		299
cry1Ac	AGAAGATATCCAATTCGAACAGTTTCCAATTAACAAGAGAAATTTATACAAACCCAGTA		660
****			
cr1Ab	TTAGAAAATTTTGATGGTAGTTTTCGAGGCTCGGCTCAGGGCATAGAAGGAAGTATTAGG		359
cry1Ac	TTAGAAAATTTTGATGGTAGTTTTCGAGGCTCGGCTCAGGGCATAGAAGGAAGTATTAGG		712
*****			

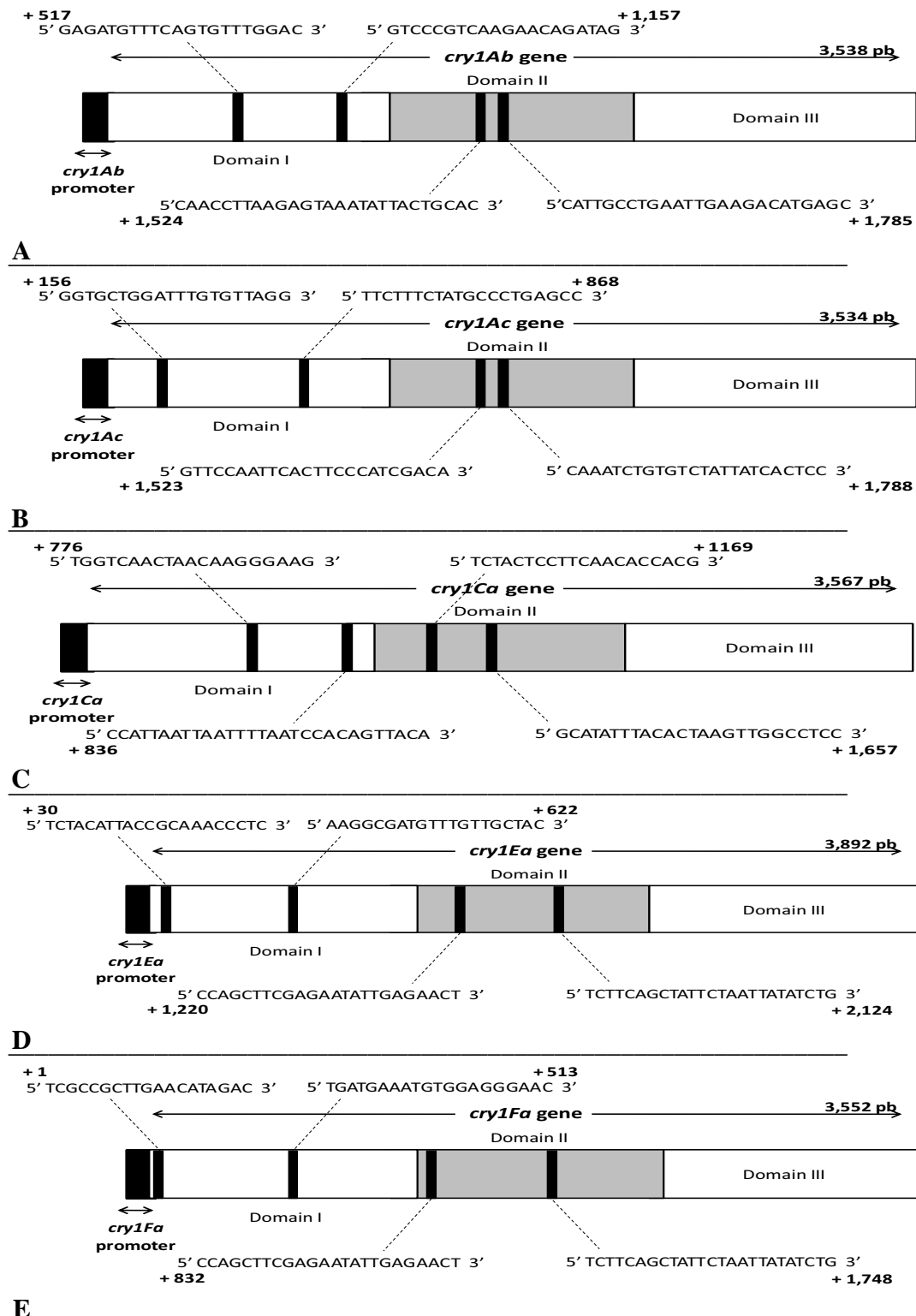
**Figura 2.** Alinhamento gerado pelo software *Clustal W* referente às regiões selecionada para a elaboração do oligonucleotídeos iniciadores para os *cry1Ab* e *cry1Ac* na região do domínio I.

## 2. Análise dos genes *cry1* com os oligonucleotídeos elaborados no domínio

### II

Os oligonucleotídeos iniciadores foram elaborados a partir das regiões selecionadas de sequências correspondentes a cada uma das cinco subclasses da família do gene *cry1*, obedecendo à lista de nomenclaturas das proteínas Cry de *B. thuringiensis* disponível no site: [http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil\\_Crickmore/Bt/toxins](http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/toxins). Para a elaboração, foram levados em consideração alguns parâmetros como: baixa concentração de bases A e T, presença de C e G nas extremidades 3' e 5' dos oligonucleotídeos e temperatura ótima de pareamento em torno de 60°C (Figura 1) (DIEFENBACH E DVEKSLER, 2003).

O alinhamento gerado para os novos fragmentos gerou baixa percentagem de identidade. Dentre esses, quando analisamos os fragmentos de amplificação para os genes *cry1Ab* e *cry1Ac* pode-se verificar uma sobreposição de 248 bases, onde apenas 122 foram idênticas, além da ocorrência de oito gaps, revelando uma identidade de apenas 49,2% entre as sequências (Figura 3). Os oligonucleotídeos iniciadores elaborados para os diferentes genes não sobrepõem regiões entre si (regiões destacadas em cinza Figura 3).



**Figura 1.** Esquema ilustrando a região de montagem dos oligonucleotídeos iniciadores e suas respectivas seqüências.

```

cry1Ab      CAACTTAAGAGTAAATATTACTGCACATTATCACAAGATATCGGGTAAGAATTCGCT 60
cry1Ac      -----GTTCCAATTCACCTCCCATCGACATCTACCAGATATCGAGTTCGTGTACGGT 52
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

cry1Ab      ACGCTTCTACCACAAATTTACAATCCATAATCAATTGACGGAAG--ACCTATTAATCA 118
cry1Ac      ATGCTTCTGTAACCCCGATTACCTCA--ACGTTAATTGGGGTAATTCATCCATTTTTC 110
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

cry1Ab      GGGGAATTTTTCAGCAACTATGA-GTAGTGGGAGTAATTTACAGTCCGGAAGCTTTAGGA 177
cry1Ac      CAATACAGTACCAGCTACAGCTACGTCATTAGA-TAATCTACAATCAAGTGATTTTGGTT 169
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

cry1Ab      CTGTAGGTTTTACTACTCCGTTTAACTTTTCAAATGGATCAAGTGTATTTACGTTAAGTG 237
cry1Ac      ATTTTGAAAGTGCCCAATGCTTTTACATCTTCATTAGGTAATATAGTAGGTGTTAGAAATT 229
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

cry1Ab      CTCATGT--CTTCAATTCAGGCAATG----- 261
cry1Ac      TTAGTGGGACTGCAGGAGTGATAATAGACAGATTG 265
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

**Figura 3.** Alinhamento gerado pelo software *Clustal W* referente as regiões selecionada para a elaboração do oligonucleotídeos iniciadores para os *cry1Ab* e *cry1Ac* na região do domínio II.

De acordo com os resultados de amplificação para o gene *cry1Ab* pode-se observar que apenas dois isolados (6,5%) apresentaram amplificação para o novo par de oligonucleotídeo iniciador, provocando uma redução da ordem de 93,5% nas amplificações (Tabela 2). Para o gene *cry1Ac* esta queda foi menor, a percentagem de isolados passou de 100% para 48,5%, onde 15 isolados amplificaram (Tabela 2) e nenhum dos 31 isolados estudados apresentaram amplificação para os gene *cry1Ca*, *cry1Ea* e *cry1Fa*.

As linhagens padrão *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD1 e var. *tolworthi* foram positivas para o gene *cry1Ab* e apenas a linhagem padrão *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD1 foi positiva para o gene *cry1Ac*, confirmando que a elaboração dos oligonucleotídeos iniciadores foram realizadas de forma correta, pois é descrito na literatura que essas linhagens possuem os referidos genes (número de acesso: AF059670.1 e DQ064597.1).

**Tabela 2.** Caracterização de diferentes isolados de *B. thuringiensis* quanto aos domínios I e II dos genes *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1Ca*, *cry1Ea* e *cry1Fa*.

Isolados	Local de isolamento	<i>cry1 Ab</i>		<i>cry1 Ac</i>	
		Domínio I	Domínio II	Domínio I	Domínio II
R <sub>25</sub>	Itapeva	+	+	+	+
R <sub>26</sub>	Campinas	+	-	+	+
R <sub>39</sub>	Capão Bonito	+	-	+	-
R <sub>74</sub>	Capão Bonito	+	+	+	+
R <sub>122</sub>	Itapeva	+	-	+	-
R <sub>123</sub>	Itapeva	+	-	+	+
R <sub>125</sub>	Itapeva	+	-	+	+
R <sub>144</sub>	Piracicaba	+	-	+	+
R <sub>148</sub>	Piracicaba	+	-	+	+
R <sub>149</sub>	Piracicaba	+	-	+	-
R <sub>155</sub>	Piracicaba	+	-	+	+
R <sub>156</sub>	Piracicaba	+	-	+	+
R <sub>158</sub>	São Paulo	+	-	+	+
R <sub>162</sub>	São Paulo	+	-	+	-
R <sub>166</sub>	São Paulo	+	-	+	-
R <sub>168</sub>	São Paulo	+	-	+	-
R <sub>180</sub>	São Paulo	+	-	+	-
R <sub>181</sub>	São Paulo	+	-	+	-
R <sub>199</sub>	Campinas	+	-	+	-
R <sub>203</sub>	Campinas	+	-	+	-
R <sub>205</sub>	Campinas	+	-	+	-
R <sub>220</sub>	Campinas	+	-	+	-
R <sub>227</sub>	Campinas	+	-	+	-
R <sub>228</sub>	Campinas	+	-	+	-
R <sub>230</sub>	Campinas	+	-	+	+
R <sub>233</sub>	Campinas	+	-	+	-
R <sub>235</sub>	Campinas	+	-	+	-
R <sub>240</sub>	Campinas	+	-	+	+
R <sub>248</sub>	Campinas	+	-	+	+
R <sub>273</sub>	Campinas	+	-	+	+
R <sub>277</sub>	Campinas	+	-	+	+
<i>var. kurstaki</i> - HD1	BGSC	+	+	+	+
<i>var. aizawai</i>	BGSC	+	-	+	-
<i>var. tolworthi</i>	BGSC	+	+	+	-
<i>var. tenebrionis</i>	BGSC	-	-	-	-
<i>var. san diego</i>	BGSC	-	-	-	-
<i>var. londrina</i>	BGSC	-	-	-	-

(+) presença de banda em gel de agarose 1,5% e (-) ausência de banda. BGSC – Bacillus Genetics Stock Center.



## DISCUSSÃO

Estudos que verificam a abundância, a distribuição e diversidade de isolados de *B. thuringiensis* quanto ao conteúdo dos genes *cry* são importantes para a busca de novas alternativas no controle de insetos-praga. Estes são em sua maioria desenvolvidos com base na técnica de PCR, onde muitas vezes é possível evidenciar a presença de novos genes *cry* e direcionar os trabalhos de bioensaios (PORCAR & JUÁREZ-PÉREZ 2003).

Nesse sentido, muitos são os trabalhos que utilizam oligonucleotídeos iniciadores já publicados para realizar triagens quanto à presença dos genes da família *cry1*. FERRANDIS et al (1999) e HERNÁNDEZ et al (2005) utilizaram oligonucleotídeos iniciadores elaborados por JUÁREZ-PÉREZ et al. (1997) para constatar a presença de genes das subclasses *cry1* em isolados provenientes da Espanha e Colômbia respectivamente e constataram que o gene *cry1Ac* foi o mais abundante, seguido dos genes *cry1Ab*, *cry1Ca*, *cry1Ea* e *cry1Fa*.

BRAVO et al (1998), URIBE et al (2003) e ARMENGOL et al (2007) ao analisarem a presença de genes da subclasse *cry1* em isolados de *B. thuringiensis* utilizando oligonucleotídeos iniciadores publicados por CÉRON et al (1994 e 1995), detectaram percentagens maiores do gene da subclasse *cry1Ab* seguida da subclasse *cry1Ac*.

Variações na distribuição e no conteúdo dos genes da família *cry1* são comumente encontradas entre as diferentes coleções de *B. thuringiensis* estudadas. No presente estudo, duas situações foram analisadas numa mesma coleção. Isolados brasileiros, do estado de São Paulo, apresentaram diferenças significativas quando submetidos a ampliações com oligonucleotídeos iniciadores elaborados em domínios diferentes, onde as percentagens de amplificação sofreram reduções da ordem de 100%. Portanto, é válido ressaltar que as diferenças encontradas não são baseadas apenas na distribuição geográfica e/ou ecologia dos isolados, mas também em relação aos oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR.

A reunião das evidências biológicas publicadas até o momento, o estudo '*in-silico*' realizado neste trabalho com as sequências selecionadas e as evidências

moleculares aqui constatadas, permitiram a elaboração de novos oligonucleotídeos iniciadores para a detecção das subclasses dos genes *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1Ca*, *cry1Ea* e *cry1Fa*. Muitos são os estudos realizados para detecção de genes da família *cry1* em coleções de diferentes países, com oligonucleotídeos já publicados. No entanto, este trabalho propôs novos oligonucleotídeos iniciadores, elaborados com exatidão em regiões pontuadas, eliminando qualquer possibilidade de sobreposição entre as subclasses.

## CONCLUSÕES

- O estudo '*in-silico*' realizado permitiu a elaboração de oligonucleotídeos iniciadores para as subclasses *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1Ca*, *cry1Ea* e *cry1Fa* com exatidão;
- A técnica de PCR confirmou as especificidades dos oligonucleotídeos iniciadores elaborados e caracterizou os diferentes isolados de *B. thuringiensis* analisados.

## REFERÊNCIAS

ARMENGOL, G.; ESCOBAR, M.C.; MALDONADO, M.E.; ORDUZ, S. Diversity of Colombian strains of *Bacillus thuringiensis* with insecticidal activity against dipteran and lepidopteran insects. **Journal Applied of Microbiology**. v.102, n.1, p.77-88, 2007.

BRAVO, A.; SARABIA, S.; LOPEZ, L.; ONTIVEROS, H.; ABARCA, C.; ORTIZ, M.; LIMA, L.; VILALOBOS, F.J.; PEÑA, G.; NUÑEZ-VALDEZ, M.E.; SOBERÓN, M.; QUINTERO, R. Characterization of cry genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied of Environmental Microbiology**. v.64, n.12, p.4965-4972, 1998.

BRAVO, A.; GILL, S.S.; SOBERÓN, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potencial for insect control. **Toxins**. v.49, p.423-435, 2007.

CERÓN, J.; COVARRUBIAS, L.; QUINTERO, R.; ARANDA, E.; LIMA, L.; BRAVO, A. PCR analysis of the *cryI* insecticidal crystal family genes from *Bacillus thuringiensis*. **Applied of Environmental Microbiology**. v.60, n.1, p.353-356, 1994.

CERÓN, J.; ORTÍZ, A.; QUINTERO, R.; GÜERECA, L.; BRAVO, A. Specific PCR primers directed to identify *cryI* and *cryIII* genes within a *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied of Environmental Microbiology**. v.61, n.11, p.1826-1831, 1995.

CRICKMORE, N. In: *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. Acessado dia 16 de outubro de 2007.

DE MAAGD, R.; BRAVO, A.; CRICKMORE, N. How *Bacillus thuringiensis* has involves toxins to colonize the insect world. **Trends Genetics**. v.17, n.4, p.193-199, 2001.

DIEFENBACH, C.W.; DVEKSLER, G.S. PCR Primer: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 2003

FERRANDIS, M.D.; JUÁREZ-PÉREZ, V.M.; FRUTOS, R. Distribution of *cryI*, *cryII* and *cryV* genes within *Bacillus thuringiensis* isolates from Spain. **System Applied of Microbiology**. v.22, n.8, p.179-185, 1999.

HERNÁNDEZ CS, ANDREW R, BEL Y.; FERRÉ, J. Isolation and toxicity of *Bacillus thuringiensis* fro potato-growing areas in Bolivia. *J Invert Pathol*. v.88, n.1, p.8-16, 2005.

JUÁREZ-PEREZ VM, FERRANDIS MD, FRUTOS R. PCR-based approach for detection of novel *Bacillus thuringiensis cry* genes. **Applied of Environmental Microbiology**. v.63, n.8, p.2997-3002, 1997.

LI, C.J.J.; ELLAR, D.J. Cristal structure of insecticide delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2,5 a resolution. **Nature**. v.353, p.815-821, 1991.

MARMUR, J. Procedure for the Isolation of Deoxyribonucleic Acid from Microorganisms. **Journal of Molecular Biology**. v.3, p.208-218, 1961.

PORCAR, M.; JUÁREZ-PÉREZ, V. PCR- based identification of *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal genes. **FEMS Microbiology Reviews**, Paris. v.26, p.419-432, 2003.

SAMBROOK J., RUSSEL, D. W. Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd ed. Cold Spring harbor Laboratory. **Cold Spring Harbor**, N.Y, 2001.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. ClustaW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acid Research**. v.22, p.4673-4680, 1997.

URIBE, D.; MARTINEZ, W.; CÉRON, J. Distribution and diversity of *cry* genes in native strains of *Bacillus thuringiensis* obtained from different ecosystems from Colombia. **Jounal of Invertebral Pathology**. v.82, n.2, p.119-127, 2003.

WU, J.Y.; ZHAO, F.Q.; DENG, G.; QIN, S.; BAO, Q.Y. Adaptative Evolution of *cry* genes in *Bacillus thuringiensis*: Implications for their Specificity Determination. **Genomics Proteomics and Bioinformatics**. v.5, n.2 , p.102-110, 2007.

### **CAPÍTULO 3 - Teste de patogenicidade de isolados de *Bacillus thuringiensis* a duas populações de *Spodoptera frugiperda*.**

**RESUMO** - *B. thuringiensis* é uma bactéria entomopatogênica muito utilizada no controle de insetos-praga e a predição de sua atividade tóxica é realizada por PCR na identificação de genes da família *cry*. Assim sendo, este trabalho objetivou testar 31 isolados de *B. thuringiensis* quanto ao potencial de controle de larvas de *S. frugiperda*, de duas diferentes populações, e associar esse potencial ao conteúdo dos genes *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1Ca*, *cry1Ea* e *cry1Fa*. Ambas as populações foram estabelecidas e mantidas em laboratório, sendo uma mantida por muitas gerações, em laboratório, e outra proveniente de uma plantação de milho, denominada população de campo. Para cada população foram utilizados 38 tratamentos com quatro repetições contendo 20 larvas de dois dias de idade. No total, 6,5% e 48,5% dos isolados possuem os genes *cry1Ab* e *cry1Ac* e nenhum os genes *cry1Ca*, *cry1Ea* e *cry1Fa*. Dentre os 31 isolados, 13 apresentaram mortalidade acima de 75% para as larvas da população de campo e apenas nove para a população de laboratório, mostrando que os isolados controlaram com maior eficiência as larvas da população de campo. Não houve correlação direta entre a presença dos genes *cry1* e a mortalidade de larvas. Diante desses resultados, verificamos a importância do estudo de diferentes populações de *S. frugiperda* quanto à susceptibilidade a isolados de *B. thuringiensis*, para melhor contornar possíveis resistências de insetos-praga às proteínas Cry com o advento das plantas transgênicas.

**Palavras-chave:** lagarta-do-cartucho, bioensaios, CL<sub>50</sub>.

### **INTRODUÇÃO**

Dentre os organismos empregados no controle biológico, *B. thuringiensis* se destaca por apresentar atividade tóxica contra espécies de insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera, estando inclusas importantes pragas agrícolas

brasileiras como *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797), *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794) e *Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1818) (LERECLUS et al., 1993). Dentre essas, a lagarta-do-cartucho, *S. frugiperda*, destaca-se por ser uma praga de grande importância econômica em diversas culturas. Na cultura do milho (*Zea mays* L.) pode causar reduções superiores a 30% na produtividade (CRUZ, 1995).

A atividade tóxica de isolados da bactéria *B. thuringiensis* é determinada pela produção de inclusões protéicas, denominadas proteínas Cry. Essas proteínas são codificadas pelos genes *cry* e, determinam a efetividade e a especificidade de uma linhagem de *B. thuringiensis* contra seus insetos-alvo.

A identificação dos genes que codificam as toxinas de *B. thuringiensis* por PCR (MULLIS, 1990) pode auxiliar na predição, mesmo que parcial, da atividade entomopatogênica de cada isolado bacteriano. Sendo assim, essa ferramenta tem se mostrado um método rápido e fácil muito utilizado na classificação preliminar de isolados bacterianos desta espécie, posteriormente avaliados em bioensaios mais dirigidos às espécies alvo de cada tipo de toxina Cry produzida (PORCAR & PÉREZ, 2003).

São conhecidos alguns genes de maior efetividade no controle da praga *S. frugiperda*, entre eles os genes *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1Ca*, *cry1Ea* e *cry1Fa* (CHILCOTT & WIGLEY, 1994; LORENCE et al., 1995; LUO et al., 1999; LOGUERCIO et al., 2001; ARANGO et al., 2002; HERNANDÉZ et al., 2004). No entanto, não há na literatura afirmações seguras de que a presença desses genes, ou a combinação dos mesmos, possa designar uma linhagem de *B. thuringiensis* como altamente efetiva contra larvas de *S. frugiperda*. Contudo, é necessária a busca por novos genes *cry* codificadores de proteínas Cry mais eficientes, assim como aumentar o número de opções de modo a contornar a ocorrência de possíveis resistências por parte dos insetos-alvo às toxinas Cry.

Este trabalho objetivou testar o potencial de controle de isolados de *B. thuringiensis* para diferentes populações de *S. frugiperda*, bem como estimar a  $CL_{50}$  dos isolados que apresentaram melhor potencial de controle.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1. Isolados Bacterianos

Foram analisados 31 isolados de *B. thuringiensis* obtidos de amostras de solos de diferentes locais do Estado de São Paulo pertencentes ao Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA), junto ao Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária na Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal-SP. Além destes, foram utilizadas seis linhagens padrão: *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD1, var. *aizawai*, var. *tolworthi*, var. *tenebrionis*, var. *londrina* e var. *san diego*, como controles positivos e negativos.

Os 31 isolados e as seis linhagens padrão foram previamente caracterizados molecularmente no capítulo 2, em relação ao conteúdo gênico dos genes *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1Ca*, *cry1Ea* e *cry1Fa*. No total, 6,5% e 48,5% dos isolados possuem os genes *cry1Ab* e *cry1Ac*, respectivamente, e nenhum apresentou os genes *cry1Ca*, *cry1Ea* e *cry1Fa*.

### 2. Criação de *S. frugiperda*

Para a realização dos bioensaios duas populações de *S. frugiperda* foram mantidas, segundo Barreto et al. (1999) para assegurar a disponibilidade contínua de larvas do inseto, durante todo o período experimental. Uma população foi estabelecida em laboratório com larvas oriundas de uma plantação de milho (*Zea mays* L.) localizada na fazenda experimental da UNESP-FCAV, cuja qual foi denominada população de campo, a outra população foi denominada população de laboratório, pois se encontra em laboratório durante muitas gerações. Ambas foram mantidas no Laboratório de Ecologia Aplicada junto ao Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal-SP. A sala de criação apresenta condições de temperatura ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ), umidade relativa do ar ( $70 \pm 10\%$ ) e fotoperíodo (14 h de luz: 10 h de escuro) controladas.

### 3. Bioensaios dos isolados para controle de larvas de *S. frugiperda*

O delineamento experimental inteiramente casualizado foi constituído de 38 tratamentos e quatro repetições, com vinte lagartas cada. Dentre os 38 tratamentos utilizados, 31 foram compostos por isolados, seis por linhagens padrão e uma testemunha, no qual utilizou-se água com 0,05% de Tween-20 (espalhante adesivo).

Para tanto os isolados de *B. thuringiensis* e as linhagens padrão foram inoculados em placas de Petri contendo nutriente Agar (NA) e incubados a 30°C por 120 h, para completa esporulação. Após esse período todo o conteúdo bacteriano foi coletado e, uma suspensão com concentração  $3 \times 10^8$  esporos.ml<sup>-1</sup> foi preparada.

Os cubos de dieta artificial (3 cm<sup>3</sup>) foram mergulhados na suspensão de esporos/cristais de cada isolado por 2 min e em seguida transferidos para placas de poliestileno contendo 16 cédulas. Após a secagem em fluxo laminar por 30 min, as larvas de dois dias de idade de *S. frugiperda*, foram cuidadosamente transferidas à dieta artificial tratada e mantidas em uma sala com as mesmas condições da sala de criação.

As avaliações de mortalidade foram realizadas no primeiro, terceiro, quinto e sétimo dia, após a exposição da larva à dieta tratada. Os dados de percentagem de mortalidade foram submetidos à análise de variância utilizando o software ESTAT, sendo o agrupamento das médias realizado pelos procedimentos matemáticos de Scott & Knott (1974).

### 4. Estimativa da CL<sub>50</sub>

Os quatro isolados que apresentaram mortalidade acima de 90% para as duas populações testadas nos bioensaios seletivos e a linhagem padrão *B. thuringiensis* var. *tolworthi* foram submetidos a bioensaios de concentrações, onde foi estimada a concentração letal necessária para matar 50% da população de laboratório (CL<sub>50</sub>) de cada isolado.



Foram utilizadas quatro diferentes concentrações, que variaram de  $3 \times 10^8$  a  $1,5 \times 10^7$  esporos.ml<sup>-1</sup>, com duas concentrações intermediárias referentes à:  $1,5 \times 10^8$  e de  $3 \times 10^7$  esporos.ml<sup>-1</sup>.

As avaliações dos parâmetros mortalidade e peso das lagartas foram realizados 20 dias após a exposição das mesmas a dieta tratada. Os dados de mortalidade, em percentagem, e peso médio final das lagartas vivas, em gramas, de cada tratamento nas quatro concentrações foram submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ) no software ESTAT.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A mortalidade média de larvas, para as duas populações, de *S. frugiperda* obtida pelos diferentes tratamentos utilizados encontram-se descritas na Tabela 2.

O Agrupamento das médias de Scott-Knot classificou a mortalidade média obtida entre as duas populações em 11 grupos. A análise de variância para cada isolado dentro das diferentes populações revelou diferenças significativas para 24 isolados, sendo 20 significativos ao nível de 1% de probabilidade e quatro ao nível de 5%. Diferenças na susceptibilidade de larvas às toxinas Cry presente em oito isolados de *B. thuringiensis* foram constatadas em três diferentes populações do inseto da América Latina (Monnerat et al, 2006).

Em relação as linhagens padrão utilizadas foi constatado diferenças de mortalidade entre as duas populações para as linhagens padrão var. *aizawai* e var. *kurstaki* HD1 ao nível de 1% de probabilidade. O teste de Scott-knot aplicado às médias entre as duas populações não foi significativo para sete isolados, ou seja, os mesmos se comportaram de forma semelhante no controle das duas diferentes populações. O mesmo aconteceu para as linhagens padrão var. *tolworthi*, var. *tenebrionis*, var. *londrina* e var. *san diego*.

**Tabela 2.** Mortalidade média de larvas de duas populações brasileiras de *S. frugiperda* obtida com suspensões dos isolados bacterianos a concentração de  $3 \times 10^8$  esporos  $\text{ml}^{-1}$ .

Isolados	Mortalidade (%)	
	População de Laboratório	População de Campo
R <sub>25</sub>	21,3 Bg ± 5,2	100,0 Aa ± 0,0
R <sub>26</sub>	100,0 Aa ± 0,0	100,0 Aa ± 0,0
R <sub>39</sub>	65,0 Bc ± 3,5	92,5 Ab ± 3,2
R <sub>74</sub>	12,5 Bh ± 3,2	98,7 Aa ± 1,3
R <sub>122</sub>	27,5 Bg ± 4,3	76,2 Ac ± 2,4
R <sub>123</sub>	37,5 Af ± 8,8	5,0 Bh ± 2,0
R <sub>125</sub>	37,5 Af ± 3,2	0,0 Bh ± 0,0
R <sub>144</sub>	32,5 Ag ± 3,2	5,0 Bh ± 2,0
R <sub>148</sub>	55,0 Ad ± 6,1	53,7 Ae ± 2,4
R <sub>149</sub>	38,7 Af ± 8,8	0,0 Bh ± 0,0
R <sub>155</sub>	98,7 Aa ± 1,3	0,0 Bh ± 0,0
R <sub>156</sub>	22,5 Ag ± 3,3	7,5 Bh ± 1,4
R <sub>158</sub>	0,0 Ai ± 0,0	20,0 Bg ± 0,0
R <sub>162</sub>	0,0 Bi ± 0,0	20,0 Ag ± 0,0
R <sub>166</sub>	8,7 Ah ± 2,4	0,0 Bh ± 0,0
R <sub>168</sub>	10,0 Ah ± 3,5	15,0 Ag ± 4,6
R <sub>180</sub>	5,0 Ai ± 2,0	0,0 Ah ± 0,0
R <sub>181</sub>	12,5 Ah ± 1,4	2,5 Bh ± 1,44
R <sub>199</sub>	6,2 Bh ± 1,3	90,0 Ab ± 2,0
R <sub>203</sub>	42,5 Bf ± 3,2	60,0 Ae ± 0,0
R <sub>205</sub>	87,5 Ab ± 3,2	90,0 Ab ± 2,0
R <sub>220</sub>	3,75 Bi ± 1,3	90,0 Ab ± 2,0
R <sub>227</sub>	91,2 Ab ± 5,9	76,2 Bc ± 2,4
R <sub>228</sub>	26,2 Bg ± 3,8	66,2 Ad ± 2,4
R <sub>230</sub>	90,0 Ab ± 4,6	95,0 Aa ± 0,0
R <sub>233</sub>	100,0 Aa ± 0,0	82,5 Bb ± 1,4
R <sub>235</sub>	48,7 Ae ± 3,8	40,0 Bf ± 2,0
R <sub>240</sub>	51,2 Be ± 4,7	73,7 Ac ± 2,4
R <sub>248</sub>	100,0 Aa ± 0,0	65,0 Bd ± 0,0
R <sub>273</sub>	91,3 Bb ± 4,3	100,0 Aa ± 0,0
R <sub>277</sub>	92,5 Ab ± 3,2	100,0 Aa ± 0,0
var. <i>kurstaki</i> - HD1	26,2 Bg ± 3,8	80,0 Ac ± 2,0
var. <i>aizawai</i>	3,75 Ai ± 2,4	20,0 Bg ± 0,0
var. <i>tolworthi</i>	95,0 Ab ± 2,0	92,5 Aa ± 2,0
var. <i>tenebrionis</i>	0,0 Ai ± 0,0	0,0 Ah ± 0,0
var. <i>san diego</i>	0,0 Ai ± 0,0	0,0 Ah ± 0,0
var. <i>londrina</i>	0,0 Ai ± 0,0	0,0 Ah ± 0,0
testemunha	0,0 Ai ± 0,0	0,0 Ah ± 0,0

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knot. Letras maiúsculas referem-se à comparação de tratamentos na linha e minúsculas referem-se à comparação de tratamentos na coluna.

A análise de variância aplicada dentro de cada população gerou a formação de nove grupos para a população de laboratório e oito grupos para a de campo.

Dentre os nove grupos estabelecidos na população de laboratório, dois agruparam nove isolados por apresentarem mortalidade média inferior a 12,5%. Cinco grupos relacionaram 13 isolados com mortalidade entre 21,2 e 65% e a linhagem padrão var. *kurstaki* HD1. Em seguida foram formados outros dois grupos com mortalidade superior a 87,5% que englobou nove isolados e a linhagem padrão var. *tolworthi*.

Para os oito grupos obtidos para a população de campo, dois classificaram 12 isolados com mortalidade igual ou inferior a 20% e outros dois, agruparam 11 isolados com mortalidade superior a 82,5%. Os demais grupos classificaram oito isolados com mortalidade entre 40 e 80%. Mostrando que os isolados estudados possuem maior potencial de controle para a população de campo.

A linhagem padrão *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD1, que é uma linhagem usada comercialmente como bioinseticida, mostrou diferenças significativas entre o controle da população de campo e de laboratório (Tabela 2). A população de campo foi controlada com eficiência, sugerindo que a população de laboratório possa apresentar uma marca de resistência aos genes expressos que esta linhagem padrão possui. A redução de controle apresentada entre as diferentes populações sugere que a susceptibilidade de larvas a essa linhagem possa estar ligada às diferenças presentes nos receptores de membrana do intestino dos insetos de cada população (ZHANG et al., 2005).

Nos testes de atividade biológica com a linhagem padrão *B. thuringiensis* var. *tolworthi*, tanto a população de campo como a de laboratório, foram altamente controladas, não apresentando diferenças significativas (Tabela 2). A alta mortalidade obtida pela linhagem padrão var. *tolworthi* é semelhante aos resultados obtidos por HERMANDEZ (1988) e VALICENTE & FONSECA (2004) que relatam uma mortalidade igual a 100% e 95,8% para larvas de *S. frugiperda*, respectivamente.

A não utilização desta linhagem no controle da praga alvo sugere que as populações testadas não sofreram pressão de seleção aos genes expressos nesta linhagem. Esta é descrita, em alguns trabalhos, como coleóptera-positiva, embora

alguns outros relatem a presença de genes *cry1* na mesma. Isto pode estar relacionado a um processo de evolução bacteriana.

Em relação ao conteúdo dos genes *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1Ca*, *cry1Ea* e *cry1Fa* (Tabela 1) pode-se observar que os isolados R<sub>25</sub> e R<sub>74</sub> e a linhagem padrão var. *kurstaki* HD1, foram os únicos que apresentaram conjuntamente os genes *cry1Ab* e *cry1Ac*, e classificados em baixa mortalidade quando submetidos ao teste seletivo na população de laboratório e alta mortalidade para a população de campo.

Evidências do envolvimento do gene *cry1Ac* nos elevados índices de toxicidade a larvas de *S. frugiperda* foram encontradas por FATORETTO et al, 2007. Os autores descrevem que as proteínas Cry1Ab e Cry1Ac são semelhantes por ligarem-se às microvilosidades apicais do intestino das larvas. Desta forma a diferença encontrada na toxicidade das diferentes populações pode estar ligada à taxa de expressão dos genes detectados, que podem estar competindo pelo mesmo receptor ou então está relacionada a uma marca de resistência presente na população de laboratório em relação aos genes expressos nos diferentes isolados.

Os isolados R<sub>26</sub>, R<sub>230</sub>, R<sub>273</sub>, R<sub>277</sub> e a linhagem padrão var. *tolworthi* foram submetidos ao bioensaio de concentrações, pois causaram mortalidade acima de 90% das duas populações (Tabela 3).

**Tabela 3.** Mortalidade média da população de laboratório de *S. frugiperda* obtida nas quatro diferentes concentrações testadas.

	Concentrações			
	1,5x10 <sup>7</sup>	3,0x10 <sup>7</sup>	1,5x10 <sup>8</sup>	3,0x10 <sup>8</sup>
R <sub>26</sub>	5,00 Bd	27,5 Ac	62,50 ABb	100 Aa
R <sub>230</sub>	0,00 Bc	8,75 Bc	33,75 Cb	90,00 Aa
R <sub>273</sub>	10,00 ABd	28,75 Ac	53,75 Bb	91,00 Aa
R <sub>277</sub>	18,75 Ab	26,25 Ab	30,00 Cb	93,00 Aa
var. <i>tolworthi</i>	18,75 Ad	33,75 Ac	70,00 Ab	95,00 Aa

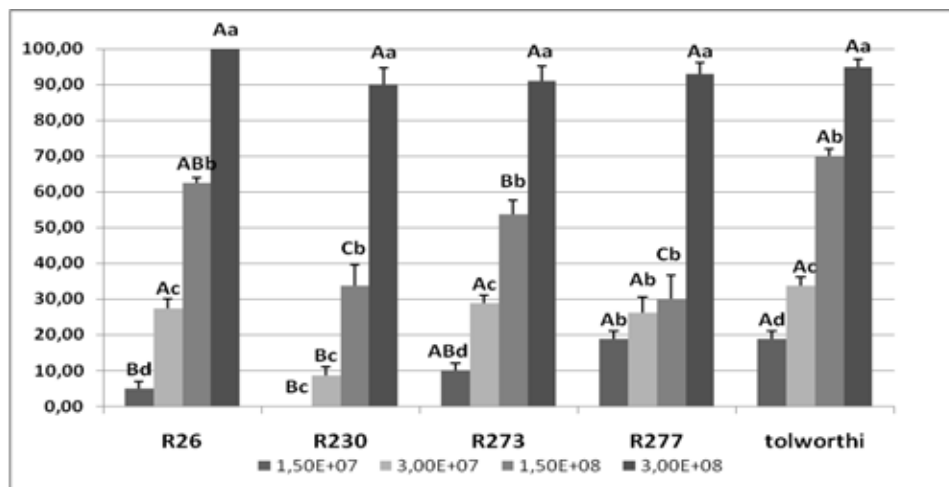
Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1%. Letras minúsculas referem-se à comparação dos tratamentos na linha e maiúscula à comparação na coluna.

Em relação ao comportamento das diferentes concentrações nos isolados, os valores do teste F foram significativos ao nível de 1% de probabilidade, indicando que os mesmos se comportaram de forma diferente quando submetidos às concentrações: 1,5x10<sup>7</sup>, 3,0x10<sup>7</sup> e 1,5x10<sup>8</sup> esporos.ml<sup>-1</sup> em relação à mortalidade de *S. frugiperda* da população de laboratório. A concentração 3,0x10<sup>8</sup> esporos.ml<sup>-1</sup> foi não significativo

(5%), indicando que não houve diferenças significativas entre os isolados para essa concentração.

O efeito da concentração nos isolados foi significativo ao nível de 1% de probabilidade, indicando que existe diferença entre as concentrações, dentro de cada isolado, em relação à mortalidade de *S. frugiperda* da população de laboratório com um grau de confiança superior a 99% de probabilidade.

Os isolados R<sub>26</sub> e R<sub>273</sub> e a linhagem padrão var. *tolworthi* apresentaram diferenças significativas ao nível de 1% de probabilidade entre todas as concentrações testadas. Para o isolado R<sub>230</sub> as duas menores concentrações testadas não diferem entre si e as demais diferem ao nível de 1% de probabilidade. Em relação aos dados de mortalidade de *S. frugiperda* obtidos nas diferentes concentrações do isolado R<sub>277</sub>, apenas a maior concentração se diferiu das demais ao nível de 1% de probabilidade.



**Figura 1.** Mortalidade média (%) para cada isolado dentro das diferentes concentrações testadas.

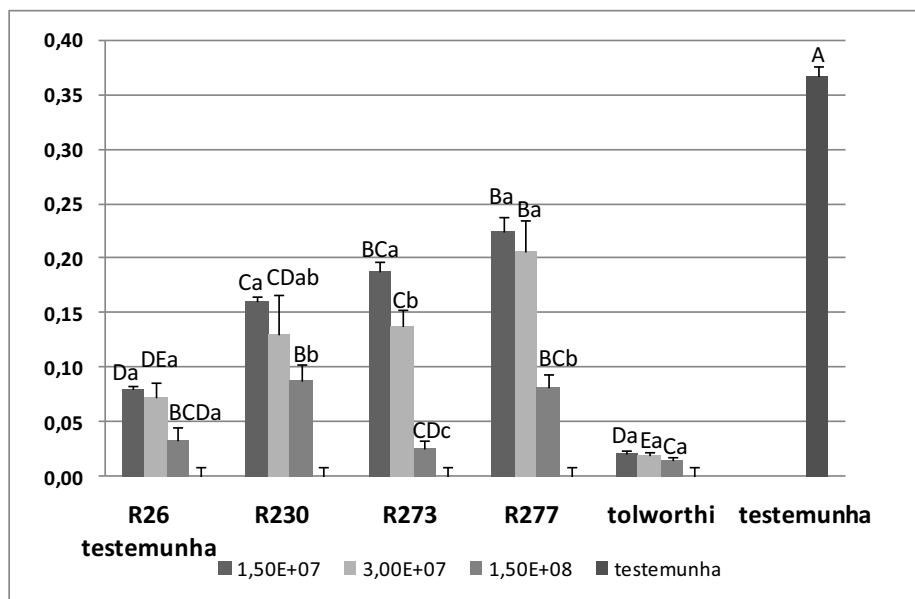
Em relação ao peso médio de lagartas vivas pode-se observar diminuição de peso entre as lagartas tratadas, com as suspensões de *B. thuringiensis*, e à testemunha (Figura 2).

Essa redução mostra que muitas vezes as larvas não morrem, mas que a aplicação de alguns isolados de *B. thuringiensis* leva a população de larvas a um crescimento mais lento e até a um mau desenvolvimento das fases posteriores a aplicação. Estas variações permitiram o controle das larvas e, dessa forma, minimizariam os danos causados às culturas.

**Tabela 4.** Peso médio das lagartas vivas da população de laboratório de *S. frugiperda* após tratamento com as quatro diferentes concentrações testadas.

Isolados	Concentrações			
	1,5x10 <sup>7</sup>	3,0x10 <sup>7</sup>	1,5x10 <sup>8</sup>	3,0x10 <sup>8</sup>
R <sub>26</sub>	0,081 Da	0,072 DEa	0,032 BCDA	----
R <sub>230</sub>	0,161 Ca	0,131 CDab	0,087 Bb	----
R <sub>273</sub>	0,188 BCa	0,137 Cb	0,026 CDc	----
R <sub>277</sub>	0,224 Ba	0,206 Ba	0,083 BCb	----
var. <i>tolworthi</i>	0,021 Da	0,019 Ea	0,014 Da	----
Testemunha				0,36 A

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1%. Letras minúsculas referem-se à comparação dos tratamentos na linha e maiúscula à comparação na coluna.



**Figura 2.** Peso médio de larvas vivas (g) para cada isolado dentro das diferentes concentrações.

Diante desses resultados podemos verificar a importância do estudo de diferentes populações de *S. frugiperda* quanto à susceptibilidade a isolados de *B. thuringiensis*, o que tornará possível agrupar dados para um melhor entendimento da ação das proteínas Cry em larvas de insetos-praga importantes para agricultura brasileira.

## CONCLUSÕES

- Há diferenças no potencial de controle dos isolados de *B. thuringiensis* em relação às populações de *S. frugiperda*;
- A presença conjunta dos genes *cry1Ab* e *cry1Ac* nos isolados de *B. thuringiensis* foi associada a baixo potencial de controle de larvas de *S. frugiperda* da população de laboratório e alta mortalidade a população de campo.

## REFERÊNCIAS

- ARANGO, J.A.; ROMERO, M.; ORDUZ, S. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Colombia with insecticidal activity against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal Applied of Microbiology**. v.92 p. 466-74, 2002.
- BARRETO, M.R.; LOGUERCIO, L.L.; VALICENTE, F.H.; PAIVA, E. Insecticidal activity of culture supernatants from *Bacillus thuringiensis* Berliner strains against *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) larvae. An. Soc. Entomol. Brasil, v.28, p.675-685, 1999.
- CHILCOTT, C.N.; WIGLEY, P.J. Isolation and toxicity of *Bacillus thuringiensis* from soil insect habitats in New Zealand. **Journal of Invertebral Pathology**. Duluth, v.61, n.3, p.244-247, 1994.
- CRUZ, I. **A lagarta do cartucho na cultura do milho**. 1.ed. (Circular Técnica, 21). Sete lagoas: EMBRAPA/CNPMS, 1995. 45p.
- FATORETTO, J.C.; SENA, J.A.D; BARRETO, M.R.; LEMOS, M.V.F.; BOIÇA-JUNIOR, A.L. Associação de bioensaios e caracterização molecular para a seleção de novos isolados de *Bacillus thuringiensis* efetivos contra *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology**. v.36, n.5, p.737-745, 2007.

HERMANDEZ, J.L.L. Évaluation de la toxicité de *Bacillus thuringiensis*. **Etmophaga**. v.33, p.163-171, 1988.

HERNÁNDEZ, C.S.; RODRIGO, A.; FERRÉ, J. Lyophilization of lepidopteran midguts: a preserving method for *Bacillus thuringiensis* toxin binding studies. **Journal of Invertebral Pathology**. Duluth, v.85, n.3, p.182-187, 2004.

ISHAWATA, S. On a severe flacherie (sotto disease). **Dainihon Sanshi Kaiho**. v.114, p.1-5, 1901.

LERECLUS, D.; DELECLUSE, A.; LECADET, M.M. Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. In: ENTWISTLE, P.F.; CORY, J.S.; BAILEY, M. J.; HIGGS, S. ***Bacillus thuringiensis* an environmental biopesticide: theory and practice**. 1 ed. Oxford: Copyright, 1993. v.1, p.37-70.

LOGUERCIO, L.L.; SANTOS, C.G.; BARRETO, M.R.; GUIMARAES, C.T.; PAIVA, E. Association of PCR and feeding bioassays as a large-scale method to screen tropical *Bacillus thuringiensis* isolates for a *cry* constitution with higher insecticidal effect against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. **Letters in Applied Microbiology**. Oxford, v.32, n.5, p. 362-367, 2001.

LORENCE, A.; DARZON, A.; DIAZ, C.; LIEVANO, A.; QUINTERO, R.; BRAVO, A. Delta-endotoxins induce cation channels in *Spodoptera frugiperda* brush border membranes in suspension and in planar lipid bilayers. **FEBS Letters**. v.360, n.3, p.217-222, 1995.

LUO, K.; BANKS, D.; ADANG, M.J. Toxicity, binding and permeability analyses of four *Bacillus thuringiensis* Cry1  $\delta$ -endotoxins using brush border membrane vesicles of *Spodoptera exigua* and *Spodoptera frugiperda*. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington, v.65, n.2, p.457-464, 1999.



MONNERAT, R.; MARTINS, E.; QUEIROZ, P.; ORDÚZ, S.; JARAMILLO, G.; BENINTENDE, G.; COZZI, J.; REAL, M.D.; MARTINEZ-RAMIREZ, A.; RAUSSEL, C.; CERÓN, J.; IBARRA, J.E.; RINCON-CASTRO, M.C.DEL, ESPINOZA, A.M.; MEZA-BASSO, L.; CABRERA, L.; SÁNCHEZ, J.; SOBERON, M.; BRAVO, A. Genetic Variability of *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) populations from Latin America is associated with variations in susceptibility to *Bacillus thuringiensis* Cry toxins. **Applied of Environmental Microbiology**. 2006.

MULLIS, K.B. The unusual origin of the polymerase chain reaction. **Scientific American**. New York, v.262, n.4, p.56-65, 1990.

PORCAR, M.; JUÁREZ-PÉREZ, V. PCR- based identification of *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal genes. **FEMS Microbiology Reviews**, Paris. v.26, p.419-432, 2003.

SCOTT, A.J.; KNOTT, M.A. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometric**, Washington, v.30, p.507-512, 1974.

VALICENTE, F.H & FONSECA, M.M. Susceptibilidade da lagarta-do-cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda*, a diferentes isolados de *Bacillus thuringiensis*. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**. v.3, n.1, p.21-29, 2004.

VALICENTE, F.H.; BARRETO, M.R.; VASCONCELOS, M.J.V.; FIGUEIREDO, J.E.F.; PAIVA, E. Identificação através de PCR dos genes *cry1* de cepas de *Bacillus thuringiensis* berliner eficientes contra a lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Itabuna. v.29 n.1, p. 147-153, 2000.

ZHANG, X.; CANDAS M.; GRIKO, N.B.; ROSE-YOUNG, L.; BULLA-JR, L.A. Cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab depends on specific binding of the toxins to the cadherin receptor BT-R1 expressed in insect cells. **Nature**. v.12, p.1407-1416, 2005.

#### **CAPÍTULO 4 - Análise da Expressão dos genes *cry1Ab* e *cry1Ac* de *B. thuringiensis* por qPCR tempo real**

**RESUMO** - A técnica de PCR tempo real é uma opção bastante atraente dentro do contexto do controle biológico de pragas, pois possibilita o monitoramento da quantificação da expressão de genes *cry* de *B. thuringiensis* e a associação desta expressão à mortalidade de larvas de pragas agrícolas. Sendo assim, a expressão dos genes *cry1Ab* e *cry1Ac* por qPCR (PCR quantitativo) tempo real foi realizada para 15 isolados e três linhagens padrão de *B. thuringiensis* com o intuito de associar a taxa de expressão destes genes à mortalidade de larvas de duas populações de *S. frugiperda*. Para tanto o RNA total dos isolados e das linhagens padrão foi extraído em dois diferentes tempos de cultivo e, em seguida, transformado em cDNA. As amostras de cDNA foram submetidas a amplificação com o fluoróforo *TaqMan*® por qPCR tempo real para os genes *cry1Ab*, *cry1Ac* e *fabI*, usado com controle endógeno; os valores Ct obtidos foram analisados no programa RQ Study pela equação  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . A expressão do gene *cry1Ab*, não foi constatada em nenhum dos isolados nas condições analisadas e, para o gene *cry1Ac*, todos os isolados apresentaram taxa de expressão em pelo menos um dos horários de isolamento. Os resultados de expressão foram associados ao potencial de controle das larvas de *S. frugiperda* das populações testadas, sendo que os elevados níveis de expressão do gene *cry1Ac* foram associados diretamente a elevado potencial de controle da população de laboratório.

**Palavras-chave:** taxa de expressão, *TaqMan*®,  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

## INTRODUÇÃO

Os organismos respondem a diferentes estímulos ambientais por meio de alterações no proteoma, conjunto de proteínas das células. Esse processo permite adaptações a condições adversas, como choque térmico, exposição a drogas, ataque de patógenos, entre outros. O fluxo da informação gênica do DNA nos cromossomos (genoma) até o proteoma é intermediado pelo conjunto das moléculas de RNA (transcriptoma). Assim, a concentração relativa dos transcritos de um determinado gene em uma célula é um indicativo do quanto esse gene está sendo expresso, ou seja, do quanto a célula está investindo do seu maquinário bioquímico para produzir a proteína codificada pelo gene (FELIX et al., 2003).

Os métodos tradicionais utilizados na análise diferencial da expressão gênica incluem, entre outros, “*northern blotting*” (ALWINE et al., 1997), “*diferencial display*” (LIANG & PARDEE, 1992), RNA “*fingerprinting*” por PCR (WELSH et al., 1992), RDA (“*representational difference analysis*”) (LISISTYN et al., 1993), SAGE (“*serial analysis of gene expression*”) (VELCULESCU et al., 1995) e “*macroarray*” (FELIX et al., 2003).

Cada uma destas técnicas apresenta vantagens únicas, tais como simplicidade e baixo custo e também algumas limitações, como a análise unidirecional e baixa especificidade. No entanto todas têm sido citadas como ferramentas indispensáveis na análise da expressão gênica (KOZIAN & KIRSCHBAUM, 1999).

As mais recentes pesquisas de quantificação gênica estão sendo realizadas pela técnica de PCR tempo real. Esta pode ser aplicada para quantificar absolutamente cópias de DNA de qualquer amostra em que se queira detectar e identificar organismos geneticamente modificados, presença de transgênicos em grãos alimentos, detecção de patógenos, kits de diagnóstico, entre outras aplicações. Paralelamente, a quantificação relativa permite a comparar taxas de expressão gênica em diferentes condições e/ou grupos celulares, tanto para procariotos como eucariotos. Os avanços da técnica de PCR tempo real fornecem aos laboratórios de pesquisa uma nova ferramenta de rotina, com uma eficiência nunca antes atingida em termos de rapidez e desempenho.

Sendo assim essa técnica é uma opção bastante atraente dentro do contexto do controle biológico de pragas, pois possibilita o monitoramento da quantificação da

expressão de genes *cry* de *B. thuringiensis* e a associação desta expressão à mortalidade de larvas de pragas agrícolas. Diante disso, a expressão dos genes *cry1Ab* e *cry1Ac* por qPCR (PCR quantitativo) tempo real foi realizada para 15 isolados de *B. thuringiensis* e três linhagens padrão com o intuito de associar a taxa de expressão destes genes à mortalidade de larvas de duas populações de *S. frugiperda*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1. Linhagens Bacterianas

Foram analisados 15 isolados de *B. thuringiensis* obtidos de amostras de solos de diferentes locais do Estado de São Paulo pertencentes ao Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA), junto ao Departamento de Biologia Aplicada a Agropecuária na Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal-SP. Além destes, foram utilizadas quatro linhagens padrão: *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD1, var. *tolworthi*, var. *kurstaki* HD73 e var. *tenebriones* (Tabela 1).

**Tabela 1.** Isolados de *B. thuringiensis* utilizados no trabalho, local de isolamento e resultado da caracterização por PCR qualitativo.

Isolados	Local de isolamento	<i>cry1 Ab</i>	<i>cry1Ac</i>
R <sub>25</sub>	Itapeva	+	+
R <sub>26</sub>	Campinas	-	+
R <sub>74</sub>	Capão Bonito	+	+
R <sub>123</sub>	Itapeva	-	+
R <sub>125</sub>	Itapeva	-	+
R <sub>144</sub>	Piracicaba	-	+
R <sub>148</sub>	Piracicaba	-	+
R <sub>155</sub>	Piracicaba	-	+
R <sub>156</sub>	Piracicaba	-	+
R <sub>158</sub>	São Paulo	-	+
R <sub>230</sub>	Campinas	-	+
R <sub>240</sub>	Campinas	-	+
R <sub>248</sub>	Campinas	-	+
R <sub>273</sub>	Campinas	-	+
R <sub>277</sub>	Campinas	-	+
<i>var. kurstaki</i> - HD1	BGSC	+	+
<i>var. kurstaki</i> – HD73	BGSC	-	+
<i>var. tolworthi</i>	BGSC	+	-
<i>var. tenebriones</i>	BGSC	-	-

(+) presença de banda em gel de agarose 1,5% e (-) ausência de banda.  
BGSC – Bacillus Genetics Stock Center.

## 2. Determinação do controle endógeno

Para a detecção do gene *fabI* um par de oligonucleotídeo iniciador foi elaborado pelo software GenRunner (Tabela 2).

**Tabela 2.** Sequências dos iniciadores para a detecção do gene *fabI*.

Iniciador	Sequência	Produto esperado (pb)
<i>fabI</i> (forward)	GCGGATACATTAGAAGGACAAG	250
<i>fabI</i> (reverse)	CTTTCTTCGCTTCTTCTTGCTAC	

As reações de amplificação para o gene *fabI*, foram conduzidas em um volume de 20 µl contendo: 60 ng de DNA molde, 250 µM de uma solução de dNTPs (10mM); 2,0 mM de MgCl<sub>2</sub> ; 0,3 µM de cada iniciador; 1,0 U da enzima *Taq* DNA polimerase

(Invitrogen®); solução tampão para a reação de PCR (1X) e água destilada Milli-Q previamente esterilizada (qsp 20 µl).

As reações de amplificação foram realizadas em aparelho termociclador (PTC-100 “Programmable Thermal Controller” - MJ Research, inc.), equipado com circuito “Hot Bonnet”, onde foi utilizado o seguinte programa: um passo inicial de desnaturação de 5 min a 95°C e 31 ciclos consistindo de um ciclo de desnaturação a 95°C por 1 min; pareamento dos oligonucleotídeos iniciadores a 50°C por 1 min e extensão a 72°C por 1 min e, ao final dos ciclos, um passo extra de extensão a 72°C por 5 min. Os produtos de amplificação foram analisados em gel de agarose a 1,5%, conforme SAMBROOK & RUSSEL (2001).

### 3. Elaboração das sondas

Dentre as opções existentes para realização de experimentos com o sistema *TaqMan*® foi selecionado o kit Custom *TaqMan*Gene Expression Assays. As sondas foram elaboradas pelo software File Builder 3.1 (Applied Biosystems) de acordo com as regiões pré estabelecidas no capítulo 2. Para o gene *cry1Ab* a sequência da sonda foi CAACCTTAAGAGTAAATATTACTGCAC e para o gene *cry1Ac* igual à GTTCCAATTCACCTTCCCATCGACA.

### 4. Cultivo dos isolados bacterianos para extração do RNA total

As fases de desenvolvimento da bactéria *B. thuringiensis* foram determinadas de acordo com GUIDELLI-THULER et al (2008). Sucessivas análises microscópicas das culturas bacterianas foram realizadas para a confirmação do comportamento dos isolados e validação das fases de desenvolvimento determinadas pelos autores.

Após a definição do tempo de isolamento do RNA, células dos diferentes isolados e das linhagens padrão de *B. thuringiensis* foram cultivadas em meio semi-sólido Nutriente Agar e incubadas a 30°C por 18 h. Colônias isoladas foram inoculadas em 50 ml de meio Caldo Nutriente e cultivadas sob agitação de 200 rpm a 30°C, por 12

h (DO 1,8) e 1 ml do pré-inoculo de cada isolado foi inoculado duas vezes em 50 ml de Caldo Nutriente. As células foram cultivadas por 6 horas e 30 min e por 8 horas, em seguida foram imediatamente submetidas à extração do RNA total.

## 5. Extração do RNA total

O isolamento do RNA total dos 15 isolados como também das linhagens padrão *B. thuringiensis* var. *kurstaki* - HD1, *B. thuringiensis* var. *tolworthi* e *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* foi obtido pelo Kit RNAspim (Amersham Biosciences®), seguindo as instruções do fabricante.

Para tanto 1 ml das culturas bacterianas foram centrifugadas a 15294 Xg por 2 min à 4°C. O precipitado bacteriano foi ressuscitado em 100µl de TE (10mM TrisHCl, 1mM EDTA - pH 7.4) com 20 mg.ml<sup>-1</sup> de lisozima e incubados a 37°C por 1 hora. Após esse período foram adicionados às amostras 350µl de tampão RA1 e 3,5µl de β-mercaptoetanol, seguida de agitação vigorosa em aparelho do tipo 'vortex'. Essa mistura foi aplicada em mini-filtro presente no kit e centrifugada a 15294 Xg por 1 min; 350µl de etanol 70% foram adicionados e misturados duas vezes em aparelho do tipo 'vortex' por 5 segundos cada.

O volume total das amostras foi aplicado à coluna de sílica e centrifugado a 8.000 Xg por 30 s, em seguida 350µl de MDB foram adicionados à membrana e centrifugados por mais 1 min a 11.000 Xg, para secar a membrana, o líquido foi descartado e a membrana foi transferida para um tubo novo estéril. Uma solução composta por 10µl de DNaseI e 90µl de tampão de reação da DNaseI foi preparada e 95µl desta foi aplicado no centro da coluna de sílica e incubado a temperatura ambiente por 15 min.

Em seguida foram realizadas três lavagens. Na primeira foi adicionado à coluna 200µl de RA<sub>2</sub>, seguida de centrifugação por 1 min a 11.000 Xg. Durante a segunda lavagem 600µl de RA<sub>3</sub> em temperatura ambiente foi aplicado e centrifugado por mais 1 min a 11.000 Xg, na última lavagem, 250µl de RA<sub>3</sub> foram adicionados à coluna e submetidos à centrifugação por 2 min a 11.000 Xg. A coluna de sílica foi transferida para um tubo estéril, livre de DNA e 100µl de água DEPC (livre de RNase) foi aplicado

e centrifugado por 1 min a 11.000 Xg. A partir desse momento o RNA estava pronto para estocagem em temperatura igual a - 80°C.

A integridade do RNA foi analisado em gel de agarose (1,2%) contendo brometo de etídeo ( $0,5 \text{ g.ml}^{-1}$ ) e submetido à eletroforese horizontal por 2 h, a 80 V, conduzida em tampão TAE 1X (Tris 89 mM, EDTA 2,5 mM e Acido Bórico 89 mM com pH 8,3), preparado com água DEPC. O gel de agarose foi visualizado sob luz UV e fotodocumentado em equipamento fotodocumentador (GEL DOC 2000 – Bio-Rad®), através do software *Quantity-one*.

As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro (BECKMAN®, modelo DU-640B), nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm, sendo a relação 260/280 calculada. Para estimar a quantidade de produto obtida foi utilizado o padrão em que uma unidade de densidade óptica (DO) equivale a 40  $\mu\text{g}$  de RNA por ml de solução (SAMBROOK & RUSSEL, 2001).

## 6. Reações de RT-PCR

Após a obtenção das amostras de RNA total a técnica de RT-PCR (transcrição reversa) foi utilizada para obtenção das amostras de cDNA. A mesma foi realizada com os componentes presentes no kit Super Script<sup>TM</sup>III First-Strand Synthesis Master Mix (Invitrogen®), seguindo as instruções do fabricante. Para tanto 1.000 ng de RNA foram adicionados a 50 ng de Random hexamers e 1 $\mu\text{l}$  de tampão de anelamento em tubos plásticos com capacidade para 0,2 ml. Os tubos foram levados ao termociclador e submetidos a uma temperatura de 65°C por 5 min, seguida de 4°C por mais 5 min.

Após esse período 10 $\mu\text{l}$  de First Strand Reaction Mix (10 mM  $\text{MgCl}_2$  e 1mM de dNTPs) e 2 $\mu\text{l}$  de SuperScript<sup>TM</sup>III/RNaseOUT<sup>TM</sup>Enzyme Mix foram adicionados, os tubos foram levados de volta ao termociclador, onde permaneceram por 10 min a 25°C, 50 min a 50°C, 5 min a 85°C e 2 min a 37°C. Em seguida 5U de enzima *RNaseH* foram adicionadas as amostras e mantidas a 37°C por 20 min, essa enzima foi utilizada para remover as fitas do RNA molde que eventualmente não foram transformadas em cDNA.

As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro (BECKMAN®, modelo DU-640B), nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm, sendo a relação 260/280



calculada. Para estimar a quantidade de produto obtida foi utilizado o padrão em que uma unidade de densidade óptica (DO) equivale a 50  $\mu\text{g}$  de DNA por ml de solução (SAMBROOK & RUSSEL, 2001). A verificação do perfil obtido pelas amostras de cDNA foi realizada através da aplicação de 4  $\mu\text{l}$  das amostra em gel de agarose a 1,5%, contendo brometo de etídeo ( $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) e submetido à eletroforese horizontal por 2 h, a 80 V, conduzida em tampão TEB 1X (Tris 89 mM, EDTA 2,5 mM e Acido Bórico 89 mM com pH 8,3), também adicionado de brometo de etídeo ( $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). O gel de agarose foi visualizado sob luz UV e fotodocumentado em equipamento fotodocumentador (GEL DOC 2000 – Bio-Rad®), através do software *Quantity-one*.

## 7. Ensaio de qPCR tempo real

Para a verificação das melhores condições de amplificação por PCR tempo real foi realizado uma quantificação absoluta por PCR em tempo real. Diferentes concentrações da amostra de cDNA da linhagem padrão *B. thuringiensis* var. *kurstatki* HD1 (200, 100, 50, 25 e  $12,5 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ) foram submetidas à amplificação com o fluoróforo *TaqMan*® (FAM™ dye-labeled). Para tanto as reações foram conduzidas em um volume final de 20 $\mu\text{l}$  contendo: DNA molde nas diferentes concentrações (12,5 a 200 ng), 10,0 $\mu\text{l}$  *TaqMan*® Universal PCR Master Mix (2x), 2,0 $\mu\text{l}$  de *TaqMan*® MGB probes (sonda) e água livre de ácidos nucleicos previamente esterilizada (qsp 20  $\mu\text{l}$ ).

Desta forma pode-se padronizar que concentração de 200ng de cDNA foi a melhor, devido a verificação de uma amplificação precoce das amostras. Para o ensaio com as diferentes concentrações de sonda pode-se verificar que a utilização de 2,0 $\mu\text{l}$  aumentou a especificidade e a eficiência da reação.

Após a determinação das melhores condições foi realizado uma quantificação relativa por PCR em tempo real para os genes *cry1Ab* e *cry1Ac*, em comparação ao gene *fabI* que foi utilizado como controle endógeno. Para tanto as reações foram realizadas para os isolados positivos, em triplicatas em placas ópticas. O ciclo utilizado foi o ciclo automático do aparelho (default PCR thermal cycling conditions) onde as amostras foram submetidas a 50°C por 2 min, 10 min a 95°C e 40 ciclos constituídos de 15 s a 95°C e 1 min a 60°C, para extensão e captação da fluorescência.

## 8. Análise dos resultados de qPCR

A análise dos resultados de expressão quantitativa dos genes estudados foi realizada pelo software RQ Study, cujo qual está acoplado ao computador do aparelho ABI (7500). Este software realiza uma comparação entre os valores Ct (cycle threshold) das amostras e utiliza o método algoritmo  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  para a determinação da expressão do gene alvo (LIVAK & SCHMITTGEM, 2001).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1. Controle endógeno

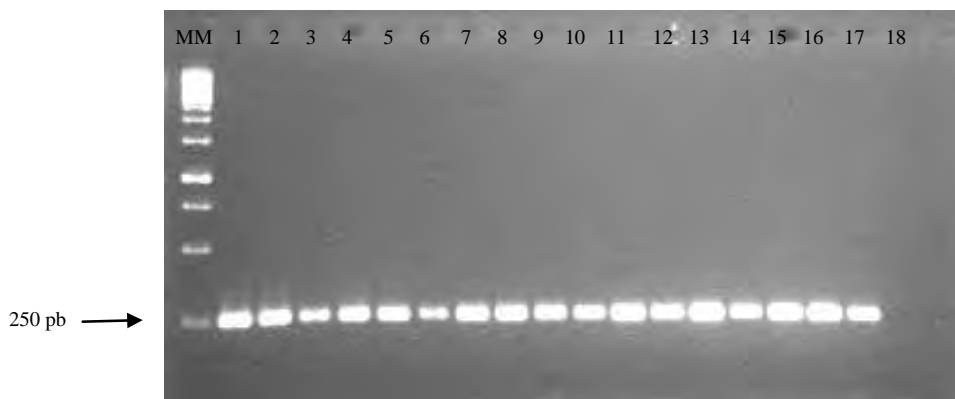
Para a validação dos resultados de qPCR tempo real, fez-se necessário a determinação de um controle endógeno, que serviu como padrão normalizador para a análise das variações de expressão dos genes testados (LIVAK & SCHMITTGEM, 2001). Sendo assim foi tomado por base o trabalho desenvolvido por Yang et al. (2005), onde os autores selecionaram o gene *sad1* como controle endógeno para a detecção do gene *cry1Ab* em plantas de algodão (*Gossypium hirsutum* L.) geneticamente modificadas.

O gene *sad1* é responsável por codificar a enzima esteroil (PTN acil - carreadora) desnaturase, que apresenta uma dupla ligação na forma cis entre o carbono 9 e 10 da família dos ácidos graxos C18 gerando ácido oléico monoinsaturado. Além disso, regula a extensão da insaturação da membrana lipídica e de óleos contidos em sementes de plantas de algodão.

Nesse sentido, o gene *fab1* foi escolhido para o desenvolvimento dessa pesquisa. O mesmo é responsável por codificar a enzima enoil (ptn acil- carreadora) - redutase NADH - dependente e pertence a via de biossíntese dos ácidos graxos típica desta espécie bacteriana. Trata-se de um gene presente na via metabólica da biossíntese de

ácidos graxos da espécie *B. thuringiensis*, e tem um nível de expressão constitutivo, sendo compatível como controle para os genes *cry* que foram avaliados neste trabalho.

Todos os isolados de *B. thuringiensis* foram positivos para o gene *fabI*, pois apresentaram bandas em gel de agarose 1,5% de tamanho equivalente ao esperado (250 pb), indicando que o mesmo pode ser utilizado nas reações de qPCR tempo real como controle endógeno (Figura 1).



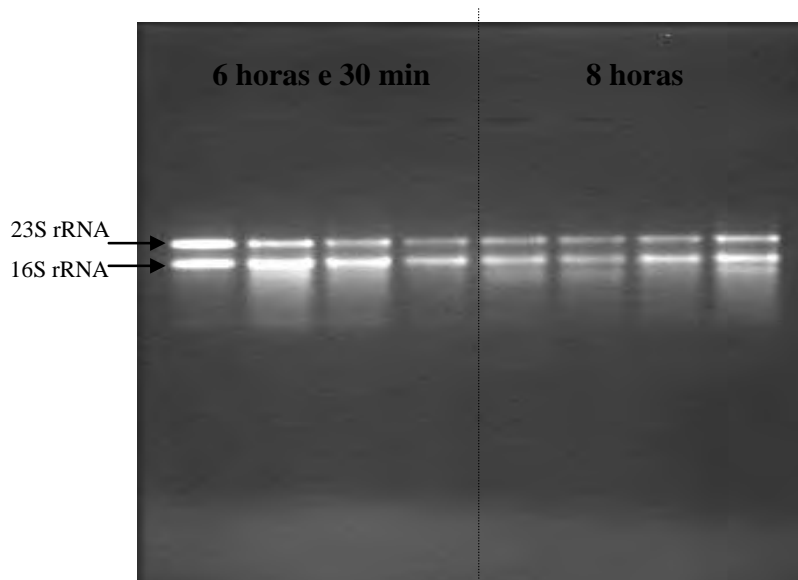
**Figura 1.** Eletroferograma da amplificação das amostras de *B. thuringiensis* com o iniciador *fabI*. MM- marcador molecular, 1 a 15 - isolados de *B. thuringiensis*, 16 - *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD1, 17 - *B. thuringiensis* var. *tolworthi* e 18 - Controle negativo da reação.

## 2. Isolamento do RNA

Duas diferentes horas de incubação foram definidas para obtenção do RNA, sendo 6 horas e 30min de cultivo e 8 horas de cultivo. Em ambas as horas as bactérias estavam em sua fase de desenvolvimento estacionária, sendo a primeira no início da fase log e a segunda ao final.

Nos eletroferogramas do RNA em gel de agarose, foram visualizadas duas bandas bem definidas contendo aproximadamente 2904 e 1542 pb, que correspondem ao 23S e 16S rRNA, respectivamente (Figura 2). Na quantificação por espectrofotômetro, as amostras de RNA que apresentaram razão de 260nm e 280nm entre 1,7 e 1,8, foram consideradas aptas para a posterior síntese de cDNA. Esta

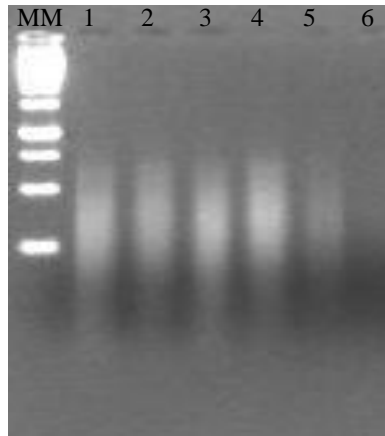
relação permite uma estimativa de pureza da amostra. Preparações puras de RNA têm  $DO_{260}/DO_{280}$  de 1,65 a 2,0 (SAMBROOK & RUSSEL, 2001).



**Figura 2.** Eletroferograma de diferentes amostras de RNA extraído de *B. thuringiensis* nos dois horários pertencentes à fase logarítmica.

### 3. Obtenção do cDNA

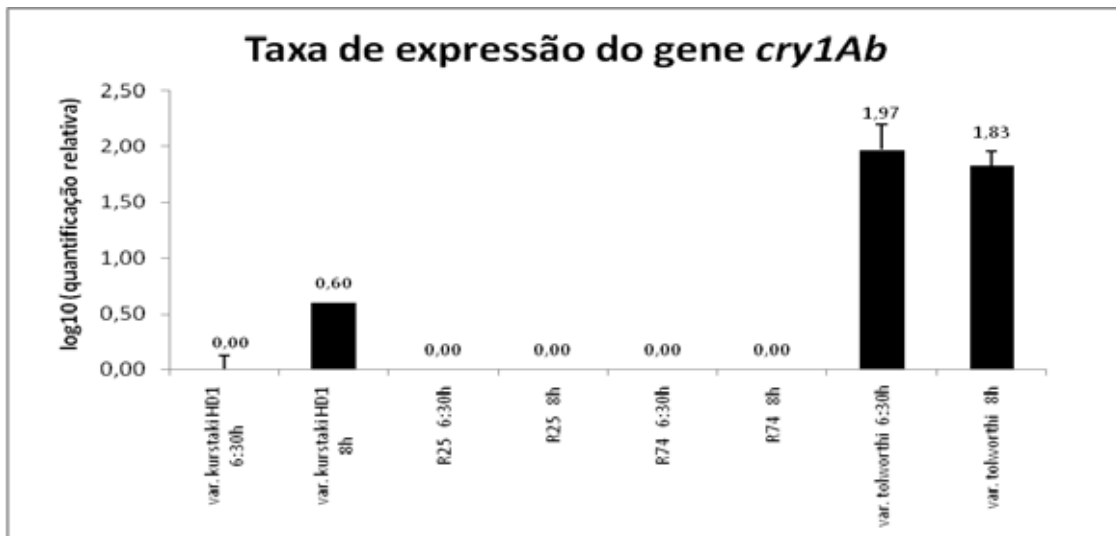
As amostras de cDNA foram quantificadas em espectrofotômetro e as que apresentaram razão de 260nm e 280nm entre 1,7 e 2,0, foram consideradas aptas para serem submetidas a análise de qPCR tempo real. Esta relação permite uma estimativa de pureza da amostra. No eletroferograma, pôde-se observar um arraste de bandas que foram obtidos pela amplificação por RT-PCR, com a utilização de “random primers” (Figura 3).



**Figura 3.** Eletroferograma referente ao cDNA obtido para as amostras. MM – marcador molecular, 1 a 5 - amostras de cDNA para diferentes isolados de *B. thuringiensis* e 6 – controle negativo da reação.

#### 4. Quantificação relativa da expressão do gene *cry1Ab*

A análise de expressão do gene *cry1Ab* foi realizada para dois isolados e para as duas linhagens padrão positivas para o gene na reação de PCR convencional, de acordo com a Tabela 1. O valor Ct do gene *cry1Ab* obtido para cada amostra foi descontado do valor Ct obtido para o gene *fabI*, normalizando assim o valor da amostra com o controle endógeno. Em seguida, esse valor foi descontado do valor do calibrador, que para esta análise foi utilizado o valor obtido para a linhagem padrão var. *kurstaki* HD1 6:30h. Os valores da taxa de expressão deste gene estão demonstrados no Gráfico 1, em valores de  $\log_{10}$ .



**Gráfico 1.** Taxa de expressão obtida para o gene *cry1Ab* nas diferentes condições e amostras testadas.

De acordo com o Gráfico 1 pode-se observar que os dois isolados de *B. thuringiensis* positivos para o gene *cry1Ab* não apresentaram expressão gênica nas condições testadas. Em relação aos padrões testados a linhagem padrão var. *kurstaki* HD1 com o horário de isolamento do RNA 6:30h foi utilizada como calibrador dos dados e com 8h de desenvolvimento sua taxa de expressão foi da ordem de 0,60. Para a linhagem padrão var. *tolworthi* foi verificada uma taxa de expressão de 1,97 e 1,83 para os diferentes horários de isolamento, mostrando que a taxa de expressão foi relativamente maior no primeiro horário de isolamento.

A taxa de expressão da linhagem var. *tolworthi* foi 3 vezes maior que a obtida para a padrão var. *kurstaki* HD1, podendo estar associada ao elevado controle das larvas de *S. frugiperda* das duas população testadas no capítulo 3. Os isolados R<sub>25</sub> e R<sub>74</sub> e a linhagem padrão var. *kurstaki* HD1 controlaram com eficiência a população de laboratório e não controlaram a população de campo; já a linhagem var. *tolworthi* controlou com eficiência as duas populações testadas. Isto sugere que os elevados níveis na taxa de expressão do gene *cry1Ab* está ligada ao elevado controle de larvas de *S. frugiperda*.

## 5. Quantificação relativa da expressão do gene *cry1Ac*

A análise de expressão do gene *cry1Ac* foi realizada para os 15 isolados e 2 linhagens padrão positivas para o gene na reação de PCR convencional, de acordo com a Tabela 1. O valor Ct do gene *cry1Ac* obtido para cada amostra foi descontado do valor Ct obtido para o gene *fabI*, normalizando assim o valor da amostra com o controle endógeno. Em seguida, esse valor foi descontado do valor do calibrador, que para esta análise foi utilizado o valor obtido para o isolado R<sub>123</sub> 6:30h. Os valores da taxa de expressão deste gene estão demonstrados no Gráfico 2, em valores de log<sub>10</sub>.

De acordo com o Gráfico 2 pode-se observar que os 15 isolados de *B. thuringiensis* positivos para o gene *cry1Ac* apresentaram expressão gênica em pelo menos uma das condições testadas. A menor taxa (- 0,44) foi observada no isolado R<sub>240</sub> com o horário de 8h, onde o gene apresentou-se sub-expresso, e a maior taxa de expressão foi constatada para o isolado R<sub>248</sub> com o horário de isolamento equivalente às 8h.

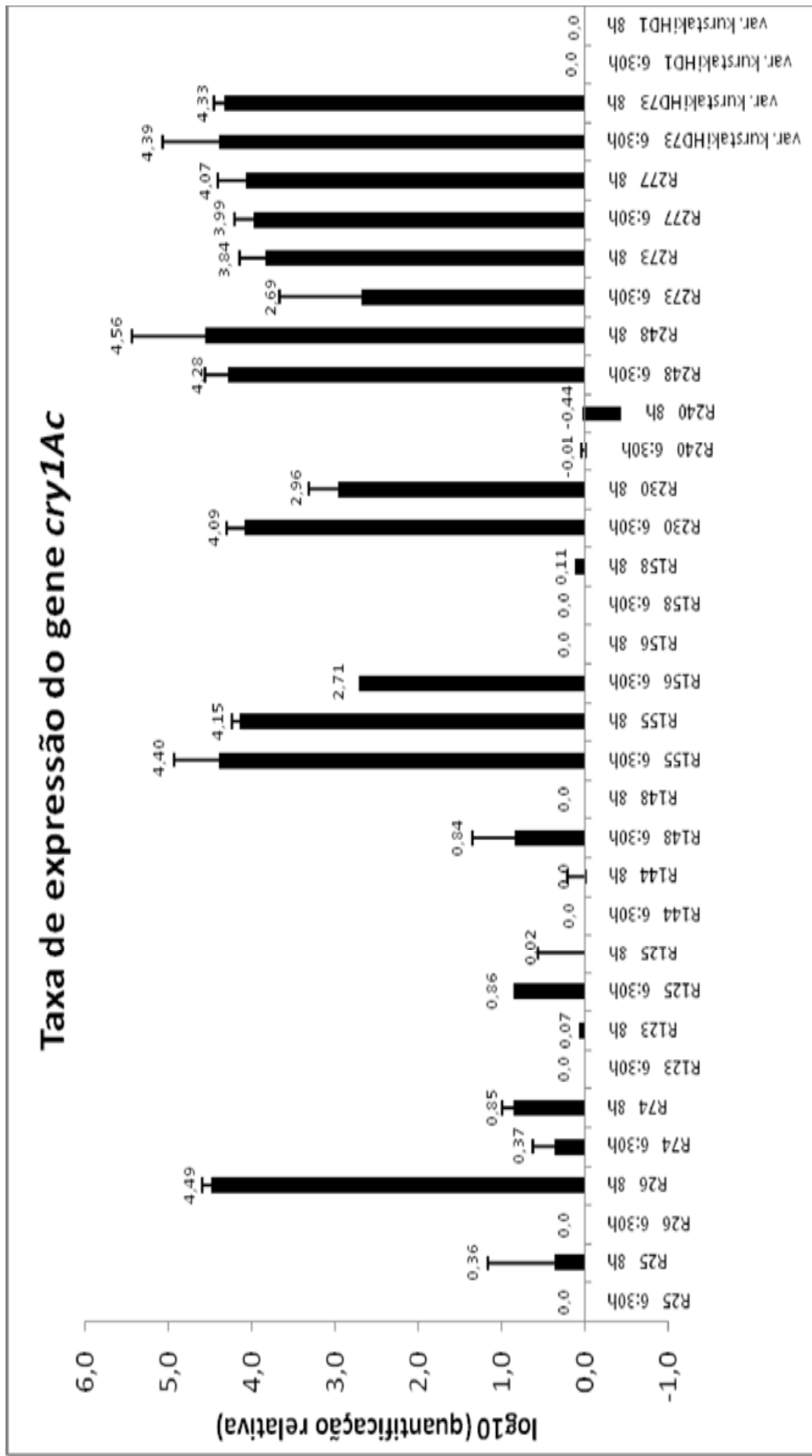


Gráfico 2. Taxa de expressão obtida para o gene *cry1Ac* nas diferentes condições e amostras testadas.



Não foi constatada expressão do gene *cry1Ac* na linhagem padrão var. *kurstaki* HD1 para as condições testadas. Para a linhagem padrão var. *kurstaki* HD73, foi verificada uma alta taxa de expressão, sendo esta da ordem de 4,39 e 4,33 para os horários 6:30h e 8h, respectivamente.

Dentre os isolados analisados, taxas de expressão superiores a 3,5 foram constatada em seis isolados, em pelo menos um horário de isolamento, sendo estes: R<sub>26</sub>, R<sub>155</sub>, R<sub>230</sub>, R<sub>248</sub>, R<sub>273</sub> e R<sub>277</sub>. Esses foram descritos no Capítulo 3, como altamente eficientes no controle da população de laboratório e apenas o isolado R<sub>248</sub> não foi eficiente para o controle das larvas da população de campo. O controle de larvas de *S. frugiperda* está diretamente ligado à taxa de expressão dos gene *cry1*, e que apenas a detecção desse gene não é indicativo de que a utilização de um isolado que o contém resultará num controle eficiente da praga.

## CONCLUSÕES

- O gene *fabI* foi adequado para ser usado como controle endógeno nos ensaios de qPCR tempo real nas condições aqui testadas;
- Elevadas taxas de expressão do gene *cry1Ac* foram constatadas nos isolados que melhor controlaram a população de *S. frugiperda* de campo.

## REFERÊNCIAS

ALWINE, J.C.; KEMP, D.J.; STARK, G.R. Methods for detection of specific RNAs in agarose gel by transfer to diazobenzyloxymethyl paper and hybridization with DNA probes. **Proc. Natl. Sci.** v.74, p.5350, 1997.

FELIX, J.M.; DRUMMOND, R.D.; NOGUEIRA, F.T.S.; ROSA JUNIOR, V.E.; JORGE, R.A.; ARRUDA, P.; MENOSSI, M. Uso de arranjos de DNA em náilon para a análise da expressão gênica em larga escala. *Genoma Funcional*.

GUIDELLI-THULLER, A.M.; ABREU, I.L.; LEMOS, M.V.F. Monitoring the expression of the sigma35 and *cry2ab* genes involved in *Bacillus thuringiensis* virulence. **Scientia Agricola**. 2008.

KOZIAN, D.H. & KIRSCHBAUM, B.J. Comparative gene-expression analysis. **Trends Biotechnology**. v.17, p.3-8, 1999.

LIANG, P.; PARDEE, A.B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. **Science**. v.257, p.967-971, 1992.

LISITSYN, N.; WIGLER, M. Cloning the differences between two complex genomes. **Science**. v.259, p.946-951, 1993.

LIVAK, K.J. & SCMITTGEN, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  Method. **Methods**. v.24, p.402-408, 2001.

SAMBROOK J., RUSSEL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**, 3rd ed. Cold Spring harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, N.Y, 2001.

VELCULESCU, V.E.; ZHANG, L.; VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K.W. Serial analysis of gene expression. **Science**. v.20, p.484-487, 1995.

WELSH, J.; CHADA, K.; DALAL, S.S.; CHENG, R.; RALPH, D.; McCLELLAND, M. Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA. **Nucleic Acids Research**. v.20, p.4965-4970, 1992.

YANG, L.; PAN, A.; ZHANG, K.; GUO, J.; YIN, C.; CHIEN, J.; HUANG, C.; ZHANG, D. Identification and Quantification of Three Genetically Modified Insect Resistant Codon Lines Using Conventional and TaqMan Real-Time Polymerase Chain Reaction Methods. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v.53, p.6222-6229, 2005.