

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

**OBTENÇÃO DE MUTANTES DE *Bacillus thuringiensis* POR
INSERÇÃO DO TRANSPOSON Tn-5 E AVALIAÇÃO DA
TOXICIDADE FRENTE A LARVAS DE *Spodoptera frugiperda*.**

Juliana Xavier Cordeiro

**Orientador: Prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos
Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo Luiz de Laia**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias- UNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Microbiologia – Área de concentração em Microbiologia Agropecuária.

Jaboticabal - São Paulo - Brasil

Agosto de 2009

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

JULIANA XAVIER CORDEIRO – Nascida em São Paulo-SP, em 19 de junho de 1979. Ingressou no curso de Ciências Biológicas na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- UNESP campus Jaboticabal – SP no ano de 2002, conferindo o título de Licenciada e Bacharel. Iniciou estágio no Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária, sob orientação do Prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos em 2003. Foi bolsista de iniciação científica da Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP) no período de 2004 a 2006. Em março de 2007 ingressou no mestrado pelo programa de Microbiologia Agropecuária, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- UNESP campus Jaboticabal – SP, com bolsa da FAPESP

*“Cada pessoa que passa em nossa vida,
Passa sozinha.
É porque cada pessoa é única
E nenhuma substitui a outra
Cada pessoa que passa em nossa vida,
Passa sozinha
E não nos deixa só
Porque deixa um pouco de si
E leva um pouquinho de nós
Essa é a mais bela responsabilidade da vida
E a prova de que as pessoas não se encontram por acaso.”*

Charles Chaplin

DEDICO

Deus, fonte de toda a sabedoria.

À minha irmã Jussara que sei que está sempre torcendo por mim.

Ao meu namorado Douglas Paixão, pelo carinho, incentivo e apoio.

À minha avó Luzia por ter se dedicado e me apoiado sempre que necessário.

À minha família, pela torcida, alegria e companheirismo mesmo com a distância.

Aos meus pais e ao meu avô Waldemar Cordeiro, que se ausentaram muito cedo da minha vida,
mas forneceram o alicerce para tocar minha vida com sabedoria e bom senso.

Agradeço à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP/FCAV e ao Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária pela estrutura e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de estudo e dos auxílios que permitiram a realização deste trabalho (processo nº 07/52875-0).

AGRADECIMENTOS

Muitas pessoas colaboraram para que este trabalho se tornasse uma experiência de grande aprendizado, o que me permitiu um valioso crescimento, tanto pela experiência de trabalho quanto pela experiência de vida. A todas essas pessoas, aqui citadas, a minha imensa gratidão. Agradeço a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho e, em especial,

Ao prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos, pela oportunidade e paciência que demonstrou durante a tarefa de orientar e pela confiança oferecida durante esses anos.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Marcelo Luiz de Laia, pela ajuda que sempre me deu desde o início do meu projeto de mestrado, sempre me auxiliando e ajudando em qualquer momento que precisasse, agradeço imensamente por tudo.

Aos integrantes da banca examinadora, Profa. Dra. Cristina Lacerda Soares Petrarolha Silva, à Prof. Dra. Janete Aparecida Desidério Sena, Profa. Dra. Maria Inês Tiraboshi Ferro, pelas sugestões oferecidas para a melhoria deste trabalho.

Ao meu namorado Douglas, que me incentivou e me ajudou em muitas tarefas tanto da minha vida quanto do trabalho, sempre muito prestativo e paciente, muito obrigada por tudo. Te amo.

A minha avó Luzia Constantino Cordeiro e minha irmã Jussara Xavier Cordeiro, que sempre me apoiaram e me deram estrutura para seguir minha jornada.

À minhas tias Célia e Selma por sempre acreditarem e torcerem por mim. Aos meus primos Danilo, Talita, Daniel e Giulia pelo companheirismo e alegria que me proporcionam no momento em que estamos presentes e mesmo com a distância sei que podemos sempre contarmos uns com os outros.

À minha grande amiga Janaina, companheira de todas as horas, pela dedicação, respeito e pelos momentos incontáveis de apoio e amizade.

Ao meu grande amigo Danilo Iha, pela alegria, amizade, companheirismo e gargalhadas. E apesar de não nos vermos diariamente como antes, sei que é um grande amigo.

Aos meus amigos da faculdade Joice, Maurício (Russo), Fer Paganelli, Matheus (Pico), Jackeline (tilápia), Iha, Flávio (pudendo), Renato (k-lado), Marcelo (Zumbi), Argos e Rafa pelos bons momentos que passamos juntos.

À minhas grandes amigas Jana e Larissa pelos momentos de amizade e cumplicidade, vocês são muito especiais e mesmo que daqui pra frente a vida nos mostre caminhos diferentes, saberemos que sempre poderemos contar uma com as outras.

Às minhas amigas companheiras de todas as horas Amanda, Renata, Vivi Boter, Carol, Luciana, pela amizade de todos esses anos.

Às amigas e companheiras do laboratório Vivian, Fernanda Sebastião, Viviane Viera, Simone, Lúcia, Rebeca, Meire, Deise, Viviane, Ju Costa, Ju Rossi, Martinha, Najara e Gabi pelo convívio e amizade. E a todos os demais companheiros do LGBBA.

À técnica do laboratório, Eliane Alves, pela disponibilidade e ajuda durante meu trabalho.

À Prof. Dr. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos e ao Dr. João Carlos Campanharo, pelo uso do Laboratório de Genética de Microorganismo e grande apoio no experimento.

À UNESP-FCAV, pela minha formação profissional e a todos os funcionários do Departamento de Biologia Aplicada.

Obrigada a todos por fazerem parte da minha vida.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE TABELAS.....	xii
RESUMO.....	xiii
SUMMARY.....	xiv
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	9
3.1 Isolados bacterianos.....	9
3.2 Preparação de células eletrocompetentes de <i>Bacillus thuringiensis</i>	9
3.3 Transferência do transposon para as células eletrocompetentes.....	11
3.4 Constituição da biblioteca de mutantes.....	12
3.5 Extração de DNA genômico dos mutantes.....	12
3.6 Confirmação da ocorrência da mutação no genoma de <i>Bacillus thuringiensis</i>	14
3.6.1 Reação da Polimerase em Cadeia.....	15
3.6.2 Análise de Southern Blot.....	16
3.6.2.1 Preparo da sonda.....	17
3.7 Quantificação da produção de esporos produzidos pelos mutantes.....	17
3.8 Bioensaio realizado com lagartas de <i>Spodoptera frugiperda</i>	18
3.8.1 Delineamento experimental.....	18
3.9 Extração de proteínas Cry.....	19
3.9.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE.....	20

4 RESULTADOS.....	21
4.1 Produção de células eletrocompetentes.....	21
4.2 Problemas encontrados.....	24
4.3 Extração de DNA genômico.....	24
4.4 Produção de biblioteca de mutantes de <i>Bacillus thuringiensis</i>	26
4.5 Confirmação da ocorrência da transformação.....	27
4.6 Quantificação da produção de esporos dos mutantes.....	31
4.7 Bioensaios.....	35
4.8 Extração da Proteína.....	38
5 DISCUSSÃO.....	40
6 CONCLUSÕES.....	44
7 REFERÊNCIAS.....	45

LISTA DE FIGURAS

		Página
1	Curva de crescimento do isolado Bt1 ao longo de 10 horas de multiplicação.....	22
2	Curva de crescimento do isolado Bt2 ao longo de 10 horas de multiplicação.....	23
3	Comparação dos dois protocolos de extração de DNA genômico e a clivagem com a enzima <i>EcoRI</i>	25
4	Gel de agarose 0,8% da extração de DNA em placas de 96 cavidades.....	26
5	Perfil eletroforético dos produtos de PCR dos 85 clones mutantes de <i>B.</i> <i>thuringiensis</i> com o oligonucleotídeo iniciador T _n _FR.....	28
6	DNA clivado com enzima <i>EcoRI</i>	29
7	Hibridização do produto de PCR dos clones mutantes de <i>B. thuringiensis</i>	30
8	Hibridização dos DNAs dos clones mutantes de <i>B. thuringiensis</i>	31
9	Distribuição de produção de esporos de 30 mutantes e um selvagem do isolado de <i>B. thuringiensis</i>	33
10	Gráfico do tipo “Box plot” evidenciando a média da produção de esporos dos mutantes comparados ao isolado selvagem.....	35
11	Porcentagem da mortalidade de lagartas de <i>S. frugiperda</i> pelos clones mutantes.....	36
12	Gráfico de caixas (box plots) mostrando a variação na eficiência em controlar lagartas neonatas de <i>S. frugiperda</i>	37
13	Gel SDS-PAGE 8% dos clones estudados.....	39

LISTA DE TABELAS

	Página
1 Densidade óptica (D.O.) de dois isolados de <i>B. thuringiensis</i> ao longo de 24 horas	22
2 Produção de esporos por mutantes do isolado Bt1 de <i>B. thuringiensis</i>	32
3 Resultado do teste de Kruskal-Wallis para a produção de esporos de 30 mutantes e 1 selvagem do isolado Bt1 de <i>B. thuringiensis</i>	34

**OBTENÇÃO DE MUTANTES DE *Bacillus thuringiensis* POR INSERÇÃO DO
TRANSPOSON Tn-5 E AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE FRENTE À LARVAS DE
*Spodoptera frugiperda***

RESUMO - *Bacillus thuringiensis* é uma bactéria gram-positiva e possui habilidade de produzir proteínas denominadas Cry ou delta-endotoxinas, durante a fase de esporulação. Estas proteínas são utilizadas no controle biológico de várias ordens de insetos. No entanto, pouco se conhece a respeito das vias metabólicas envolvidas na produção dessas proteínas, por exemplo, na natureza, é possível encontrar isolados que produzem grande quantidade de proteínas Cry, como também é possível encontrar outros isolados que produzem poucas quantidades. Considerando que essa diferença é devida a uma regulação gênica diferenciada entre isolados, a identificação dessa regulação pode levar a um incremento na produção de proteínas. Neste trabalho, foram analisados 10 clones mutantes comparados com o isolado selvagem (Bt1) quanto à mortalidade de lagartas neonatas de *Spodoptera frugiperda* considerando também a quantidade de proteínas Cry produzidas por estes mutantes. Os resultados demonstram que dois clones identificados como B9 e E2, demonstraram um bom controle dessas lagartas, mesmo aquelas que permaneceram vivas, ocorreu um atraso em seu desenvolvimento. Quanto à produção de proteínas, os clones apresentaram perfil protéico entre ~45 kDa e ~120 kDa, perfil característico encontrado entre estirpes ativas contra Lepidópteros. No entanto, os clones que apresentaram bons níveis de mortalidade (B9 e E2) mostraram somente a banda de ~65 kDa similar ao isolado selvagem, que pode ser a responsável pela sua ação inseticida. Os resultados obtidos demonstram a possibilidade de efetuar melhoramento genético em *B. thuringiensis* por meio de mutagênese mediada por transposon e abre caminho para o estudo das vias metabólicas envolvidas na produção de proteínas Cry.

Palavras-chave: *Bacillus thuringiensis*, Banco de mutantes, Controle biológico, Mutagênese, Transposon.

***Bacillus thuringiensis* MUTANT GENERATION BY THE INSERTION OF
TRANSPOSON Tn-5 AND EVALUATION OF TOXICITY TOWARDS *Spodoptera
frugiperda* LARVAE**

SUMMARY – *Bacillus* is a gram-positive bacterium and produces internal crystal inclusions named crystal (Cry) proteins or δ - endotoxins during the sporulation phase. These proteins are used to control several agriculture insect pests. However little is known concerning the metabolic pathways involved in the production of these proteins. For example, in nature, it is possible to find isolates that produce large quantities of the Cry proteins as well as it is possible to find ones that produce limited quantities. Since such difference might be related to gene regulation the identification of regulation factors found in these isolates should lead to an increment on the crystal protein production found in isolates naturally exhibiting lower production. In this work, ten mutant clones were analyzed compared to the wild type (Bt1) with respect to *Spodoptera frugiperda* neonatal larvae mortality considering also the amount of crystal protein produced by these mutants. The results have demonstrated that two mutant clones named B₉ and E₂ have produced strong control of these larvae; while at the same time eliciting a delay on the development of the ones that eventually did not die at first. As for the Cry protein content, the clones presented a protein profile ranging from ~45 kDa to ~120 kDa which is typical of Cry proteins acting on lepidopterans. The clones that have shown good mortality levels (B₉ and E₂) have exhibited only a protein band with ~65 kDa, similar to the one produced by the wild type strain, which might be related to its control activity. Finally, the results obtained seem to lead to the possibility of improving genetically *B. thuringiensis* using mutagenesis induced by transposon and at the same time might pave the way to shed light on the study of metabolic pathways involved in the Cry proteins production.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, Biologic control, Mutagenesis, Mutant bank, Transposon.

1 INTRODUÇÃO

A preocupação com o meio ambiente tem contribuído para o aumento de pesquisas científicas que visam diminuir os impactos negativos impostos ao ecossistema devido a intervenção do homem. Um desses fatores impactantes, os ditos defensivos agrícolas, possuem, na maioria dos casos, amplo espectro de ação, agindo sobre as pragas e sobre as não pragas. Além desses produtos químicos possuem altos custos, há importantes riscos para a saúde associados com o uso indiscriminado destas moléculas tóxicas, além da persistência destes produtos químicos no ambiente é também uma questão importante. Neste contexto, a utilização da engenharia genética para resistência a insetos é uma opção importante.

Não bastasse isso, o uso dessas drogas, em larga escala, tem contribuído para o aparecimento de indivíduos resistentes, fato que obriga a um aumento da dosagem e/ou o uso de compostos múltiplos, agravando seus efeitos nocivos à natureza.

Do lado oposto aos produtos químicos estão os produtos naturais utilizados como biocontroladores. O controle biológico de pragas e doenças consiste no uso de inimigos naturais ou de competidores das pragas e dos patógenos visando o controle de suas populações (DE ESCUDEIRO, 2006). Dentro destes métodos alternativos de controle se encontram os microorganismos entomopatogênicos, sendo os bioinsecticidas baseados na bactéria *Bacillus thuringiensis* (BERLINER, 1915) os mais produzidos no mundo. Enquanto o uso de inseticidas biológicos ainda permanece significativamente atrás dos inseticidas químicos sintéticos, muitos aspectos relacionados à segurança e ao meio ambiente favorecem o contínuo aumento da utilização dessa bactéria para o controle de pragas. Devido a sua alta especificidade, seu uso não causa danos aos organismos não alvos e nem a fauna, em geral (DE ESCUDEIRO, 2006). Desse modo, o uso de *B. thuringiensis* como agente de controle biológico é uma alternativa aos métodos químicos, segura para o meio ambiente, compatível com a fauna e em acordo com os desejos de sobrevivência do homem. No entanto, tem sido relatada a ocorrência de resistência às toxinas de *B.thuringiensis*, além de existir algumas pragas para a qual não foi encontrada uma proteína eficiente

no seu controle. Devido isso, esforços têm sido feito no sentido de selecionar novos isolados mais produtivos.

Em um trabalho anteriormente executado, observou-se que dois isolados (Bt1 e Bt2) que diferiram quanto à produção de esporos, deste modo, foi feito um banco de mutantes com o isolado Bt1 de *B. thuringiensis*, através de inserção aleatória do transposon por eletroporação e foi verificado através da contagem de esporos que alguns mutantes produziram mais esporos que o isolado selvagem. Foram selecionados 5 clones que produziram maior quantidade de esporos e 5 clones que produziram menor quantidade de esporos que o isolado selvagem, para a realização dos bioensaios e extração de proteínas. O objetivo deste trabalho foi produzir uma biblioteca de mutantes de *Bacillus thuringiensis* por meio de inserção do transposon, com o intuito de obter clones melhorados. E desta forma, avaliar os clones quanto a produção de esporos e quanto a efetividade no controle da lagarta de *Spodoptera frugiperda*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A primeira menção a doenças em insetos causada por este tipo de bactéria data de 1902, quando Ishiwata, no Japão, descreveu uma bactéria esporulante responsável pela mortalidade do bicho-da-seda, *Bombix mori*, e a chamou de *Bacillus sotto*. Em 1911, Berliner, na Alemanha, redescobriu a mesma bactéria isolada a partir de lagartas da traça da farinha *Anagasta kuhniella* e em 1915, a chamou de *Bacillus thuringiensis*, em homenagem a região de onde as lagartas foram coletadas (WHITELEY e SCHNEPF, 1986; DIAS, 1992). Assim, as possibilidades de utilização do *B.thuringiensis* em controle biológico, foram logo reconhecidas, e em 1938, uma formulação a base desta bactéria, a Sporeína, foi produzida na França (WEISER, 1986). A partir dos anos 1950, diversos países como a Rússia, a Checoslováquia, a França, a Alemanha e Estados Unidos, começaram a produzir inseticidas biológicos à base de *B. thuringiensis*. (WEISER, 1986).

Bacillus thuringiensis possui forma de bastonete de 1,0 a 1,2 µm de largura por 3,0 a 5,0 de comprimento. É uma bactéria Gram-positiva da família *Bacillaceae*, aeróbia facultativa, quimioheterotrófica e a temperatura ideal de crescimento em torno de 28 a 30°C. É uma bactéria de ocorrência ubíqua (KRYWUNCZYK e FAST, 1980), que pode ser encontrada em substrato de solo, água, superfície de plantas, insetos mortos e grãos armazenados (MIRALLES e PÉREZ, 2004).

Ao final da fase logarítmica de crescimento, passa por um processo de esporulação, devido à exaustão de nutrientes, produzindo um cristal protéico (proteína Cry), ou também denominadas delta-endotoxinas, que é responsável por sua ação entomopatogênica. Essa característica, presença de um cristal protéico produzido durante a fase de esporulação, é o principal critério adotado para a identificação de uma bactéria como pertencente a espécie *B. thuringiensis*.

A ação tóxica das δ -endotoxinas depende da dissolução dos cristais em meio enzimático alcalino, ou seja, as proteínas Cry são produzidas como pró-toxinas, que, para serem ativadas, devem ser processadas pelas proteases do intestino médio das larvas dos insetos, liberando o fragmento tóxico (BRAVO, 2005). Pode generalizar que o processamento típico das toxinas Cry1 se dá pelo corte dos primeiros resíduos da

região N-terminal em um sítio conservado (BRAVO, et al., 1992) e dos últimos 500 resíduos da região C-terminal, ficando dessa forma um fragmento resistente a proteases de 55 a 65 kDa, que se denomina “toxina”. Os efeitos citolíticos são mediados pela ligação da toxina ativada em receptores presentes na célula do intestino. Após a ligação da toxina ativada aos receptores específicos, são formados poros nas membranas das células precedendo um influxo de íons e água ocorrendo rápida troca de permeabilidade nas células do intestino do hospedeiro. Como resultado, ocorre na lise da célula e ruptura da integridade intestinal, permitindo que os esporos e as bactérias penetrem no corpo da lagarta e, em poucos dias, a lagarta morre por septicemia ou por inanição. Não há registros de ação da bactéria *B. thuringiensis* sobre as fases de pupa e de adulto dos insetos (MONNERAT e BRAVO, 2000).

Nas espécies de *Bacillus*, no endósporo se desenvolve um esporângio que consiste de dois compartimentos celulares conhecidos como a célula mãe e o esporo. As proteínas Cry se acumulam na célula mãe durante o processo de esporulação (SOBERÓN e BRAVO, 2001). Há diferentes etapas no processo de esporulação: no estágio I, são induzidos os genes que iniciarão a esporulação, este ponto pode ser reversível se houver adição de nutrientes. A partir do estágio II, o processo é irreversível e contínuo até finalizar, com a formação do esporo. No estágio II, a bactéria forma um septo de divisão assimétrico. No estágio III, se inicia a síntese do cristal inseticida, o qual continuará até o final da esporulação. A síntese do cristal inseticida se dá a partir dos promotores que funcionam seqüencialmente (Bt1 e Bt2). O primeiro é ativado por sigmaE durante os estágios III e IV e o segundo por sigmaK durante os estágios V e VI. Durante estes passos se dá conjuntamente a formação dos esporos. Finalmente, no estágio VII são sintetizadas enzimas líticas que liberam os esporos e os cristais inseticidas (BECHTEL e BULLA, 1976).

As δ -endotoxinas, podem apresentar diversas formas: bipiramidal, esférica, cúbica e retangular. Esses cristais vistos através de exames microscópicos podem fornecer indicações sobre atividade inseticida das estirpes. Cristais bipiramidais geralmente estão associados à proteínas Cry1, cristais cubóides à proteínas Cry2 e a morfologia de cristais relativos à proteínas Cry9 pode variar (MONNERAT e BRAVO, 2000; HABIB e ANDRADE, 1998).

Segundo MAAGD e colaboradores (2003), a bactéria *B. thuringiensis* produz ao menos três grupos de proteínas tóxicas a insetos (Cry, Cyt e VIP), tanto pragas de lavouras quanto vetores de doenças. As proteínas Cry e Cyt são produzidas durante a esporulação, como um corpo citoplasmático parasporal, e as toxinas VIP são secretadas durante o crescimento vegetativo celular (SCHNEPF et al., 1998). Os genes do grupo *cry* são os mais utilizados, podendo ser ativos, não somente contra insetos, mas a nematóides também (DIAS, 1992, SOBERÓN e BRAVO, 2001; LOGUERCIO et al., 2002).

A classificação das proteínas Cry se baseia na similaridade das seqüências de aminoácidos (CRICKMORE et al., 1998). Existem mais de 400 diferentes genes *cry* e as proteínas Cry estão agrupadas em 54 classes (CRICKMORE et al., 2008).

Dentre as estirpes de *B. thuringiensis*, algumas apresentam um único gene codificador das proteínas Cry. Outras estirpes apresentam cinco genes diferentes, como é o caso da subespécie *aizawai* HD-137 e subespécie *israelensis* IPS-82. Esta última apresentou cinco genes codificadores da δ -endotoxina e outro gene que codifica uma citolisina, todos localizados em um único plasmídeo de 72 MDa (BOURGOUIN et al., 1988). Alguns genes *cry* apresentam toxicidade a mais de uma ordem de insetos, como por exemplo, as proteínas Cry1I, tóxicas às ordens Lepidoptera e Coleoptera (TAILOR et al., 1992) e Cry1B que é ativa para as ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera (ZHONG et al., 2000). No entanto, não raro, é relatada a ocorrência de resistência às toxinas Cry (TABASHNIK et al., 1994). No entanto, a busca por novos genes *cry*, produzindo novas toxinas, é a maneira mais utilizada para driblar a ocorrência de resistência e para tentar o controle de outras pragas.

Segundo HAWTHORNE (1998), a evolução das pragas alvo, processo governado por fatores genéticos e bioecológicos que se inter-relacionam, é a responsável por esse feito. Essa evolução ocorre em resposta à seleção natural imposta pelo método de controle, limitando sua eficiência e viabilidade por longos períodos. Em virtude dessas observações, esforços têm sido concentrados no sentido de diversificar os genes de *B. thuringiensis* que são expressos em plantas, bem como na identificação e na seleção de novos isolados, mais produtivos, ou, ainda, na

modificação das seqüências dos genes *cry* de maneira a aumentar a sua produção ou modificar a sua especificidade (de MAAGD et al., 1999).

Se considerar que uma diferença na via metabólica de produção de um dado gene é devido a uma regulação, e que esta é devida a outro gene, pode-se aumentar a produção dessa proteína de interesse impedindo a expressão do gene regulador. Por outro lado, a descoberta de um gene indutor, que aumenta a expressão da proteína de interesse, pode ser utilizada em conjunto com o gene *cry*, a fim de aumentar a sua expressão. A regulação da produção de algumas proteínas Cry se encontra associado diretamente a fatores em cada um dos estágios da esporulação. Desse modo, estudos envolvendo mutação ao acaso e dirigidas, permitiram encontrar relações diretas entre as mutações e alteração na expressão dos respectivos genes (BROWN e WHITELY, 1998; BRAVO et al., 1996).

A obtenção de uma alta produção de proteínas cristal por meio de fermentação é muito importante para a indústria de bioinseticida reduzir custos e competir com os pesticidas químicos no mercado (GHRIBI et al., 2004). Logo, a seleção de um dado isolado de *B. thuringiensis* para uso no controle de uma dada praga é dependente de uma série de fatores, tais como: o isolado, espectro de ação, tecnologia de fermentação, custo de aplicação, facilidade de uso, dentre outros. Além disso, espera-se que o isolado selecionado seja altamente produtivo, o que nem sempre é encontrado na natureza.

Para superar as limitações metabólicas (ZOUARI et al., 2002), o uso de meios de cultura apropriados (ZOUARI et al., 1998, 2002; ZOUARI e JAOUA., 1999) e a otimização dos processos de fermentação (ZOUARI et al., 2002) têm sido utilizados para se obter uma alta produção de δ -endotoxinas. Alternativamente, isolados que demandem o uso de materiais e/ou produtos de baixo custo podem reduzir significativamente os custos da fermentação. Entretanto, a melhora dos isolados oferece uma grande oportunidade para a redução dos custos sem a necessidade de um aporte significativo no capital destinado à linha de produção (STANBURY et al., 1995) uma vez que os isolados melhorados podem sintetizar uma alta proporção do produto desejado utilizando a mesma quantidade de materiais. Logo, o melhoramento de um

isolado visando a alta produção industrial é a menina dos olhos de qualquer processo fermentativo industrial.

O melhoramento de um dado isolado pode ser obtido por meio de mutagênese, seleção, recombinação ou transformação genética. A mutagênese pode alterar o DNA, ocasionando deleções, adições, transversões ou substituições de bases ou completa mutação do gene, interrompendo-o (PAREKH et al., 2000). Conseqüentemente, mutagênese aleatória do genoma pode afetar uma grande quantidade de vias metabólicas da maquinaria celular, possibilitando a análise de diversos fenótipos celulares.

Atualmente, sabe-se que algumas proteínas são benéficas à expressão e posterior cristalização de proteínas Cry (ADAMS et al., 1989; CRICKMORE e ELLAR, 1992; GE et al., 1998; YOSHISUE, et al., 1992). Por exemplo, a ORF2, um aminopeptídeo de 252 aminoácidos, presente no operon Cry2Aa da espécie *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, é necessário para a formação do cristal de Cry2Aa (GE, et al., 1998). Do mesmo modo, as proteínas acessórias P20 e P19, codificadas pelo operon Cry11A (DERVYN, et al., 1995; MCLEAN e WHITELEY, 1987), de *israelensis* tem efeito na produção de Cry11A (WU e FEDERICI, 1995; YOSHISUE, et al., 1992). A ação da proteína P20 pôde ser verificada quando da coexpressão do operon Cry11A com Cyt1Aa. A proteína Cyt1Aa, que é uma toxina citolítica, tóxica à célula hospedeira, foi estruturada em cristais, inibindo o seu ataque à célula hospedeira, devido à coexpressão de P20 (ADAMS et al., 1989; VISICK e WHITELEY, 1991; WU e FEDERICI, 1993).

Recentemente, mutantes espontâneos de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* resistentes à eritromicina aumentaram a produção de δ -endotoxinas na ordem de 134 a 215%, em comparação ao produzido pelo isolado selvagem (TOUNSI, et al., 2006). Apesar desses trabalhos anteriores terem descobertos mutantes de *B.thuringiensis* altamente produtivos, somente no caso das proteínas P20 e P19 houve a identificação dos genes reguladores da expressão das proteínas Cry estudadas.

Com a descoberta dos transposons, elementos genéticos que podem mover-se dentro do genoma e afetar a regulação ou expressão de genes de maneira aleatória (HAMER et al., 2001), os estudos da função gênica ficaram facilitados. Atualmente

existem vários sistemas de mutagênese insercional aleatória (JUDSON e MEKALANOS, 2000; PELICIC et al., 2000; REICH, et al., 1999; WONG e MEKALANOS, 2000), os quais podem ser utilizados para gerar bibliotecas de mutantes que serão posteriormente analisadas por meio de mapeamento e localização das ORFs mutadas (HAMER et al., 2001; JUDSON e MEKALANOS, 2000; WONG e MEKALANOS, 2000). Com estes sistemas, a caracterização do gene afetado é obtida por meio de seqüenciamento, técnica rotineira na maioria dos laboratórios.

Por meio de mutagênese com etiquetas marcadas, 1152 mutantes de *B. thuringiensis* subsp. *mexicanensis* foram produzidos. Após análise em larvas de *Manduca sexta* (Lepidoptera), 12 mutantes com a virulência atenuada foram identificados. Por meio de seqüenciamento, genes relacionados a reguladores transcricionais, proteínas similares a histona, transposon e várias seqüências cuja função em *B. thuringiensis* é desconhecida foram identificados (STEGGLES et al., 2006). Pôde-se verificar que essa técnica é aplicável a essa bactéria com o objetivo de identificar genes previamente mutados.

Desse modo, pode-se concluir que a produção de proteínas Cry em *B. thuringiensis* pode ser aumentada interferindo nas vias metabólicas de síntese dessas toxinas. Se essa interferência for obtida por meio da inserção aleatória de transposon, o responsável por aquele efeito, o gene mutado, poderá ser identificado por meio de seqüenciamento genético de DNA. Por fim, ao aliar essas duas técnicas, além de possivelmente identificar as vias implicadas na produção de proteínas Cry, poderá produzir conhecimentos básicos à cerca de genética de bactérias.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Isolados bacterianos

Foram utilizados dois isolados (Bt1 e Bt2) da coleção de isolados de *Bacillus thuringiensis* do Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA) do Departamento de Biologia Aplicada a Agropecuária da UNESP, Campus de Jaboticabal-SP.

3.2 Preparação de células eletrocompetentes de *Bacillus thuringiensis*

Foram testadas três metodologias de produção de células eletrocompetentes usadas neste trabalho:

Metodologia 1:

Células do isolado de interesse foram semeadas em 5 mL de meio de cultura BHI, em tubos de ensaio, e multiplicados por 4 horas. Em seguida, 100 µL da suspensão de células foram cultivados em 100 mL de meio de cultura BHI (Brain Heart Infusion), a 30 °C sob agitação de 200 rpm, até atingir a densidade óptica (D.O) igual a 2,0. Após a fase de crescimento, as células foram coletadas por meio de centrifugação a 3.220 x g, 4 °C, por 10 minutos e imediatamente transferidas para banho de gelo. Procedeu-se a duas lavagens do precipitado em 30 mL de água destilada estéril gelada e novamente as células foram coletadas por meio de centrifugação a 3.220 x g por 10 minutos a 4 °C, descartando o sobrenadante. Em seguida, o precipitado foi lavado mais uma vez com 30 mL de glicerol 10% gelado e, submetido à centrifugação por 10 minutos a 3.220 x g, a 4 °C. Por fim, o precipitado foi ressuspendido em 2 mL de glicerol 10% gelado, alicotado 50 µL em tubos de 1,5 mL e armazenado em freezer a -80 °C.

Metodologia 2:

Células do isolado de interesse foram semeadas em 5 mL de meio de cultura BHI, em tubos de ensaio, e multiplicados por 4 horas. Em seguida, 100 µL da suspensão de células foram cultivados em 100 mL de meio de cultura BHI a 30 °C a 200 rpm até atingir a D.O igual a 1,2.

Em seguida, as células foram distribuídas em quatro tubos Falcon de 50 mL e, centrifugada a 3.220 x g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado com cuidado e então foram adicionados 30 mL de água milli-Q autoclavada gelada em cada tubo e homogeneizado. O conteúdo dos quatro tubos foi juntado em dois tubos e acrescentado mais 40 mL de água milli-Q autoclavada gelada, centrifugado a 3.220 x g por 15 minutos a 4 °C, e foi descartado cuidadosamente, o sobrenadante. Novamente, foram adicionados mais 30 mL de água milli-Q autoclavada, homogeneizado e centrifugado para coletar as células. O conteúdo foi transferido para 1 tubo Falcon e lavado mais duas vezes com 30 mL de glicerol 10% gelado, centrifugado a 3.220 x g a 4°C e descartado o sobrenadante. Por fim, as células foram ressuspensas em 1 mL de glicerol 10% gelado, aliqüotada 50 µL em tubos de 1,5 mL e estocadas no freezer – 80 °C até o momento do uso.

Metodologia 3:

Um pré-inóculo de células do isolado de interesse foi produzido em 3 mL de meio de cultura TSB (Tryptone Soya Broth), sob agitação de 200 rpm a 37 °C por 12 horas. Em seguida, 2 mL do pré-inóculo foram transferidos para um frasco tipo Erlenmeyer contendo 200 mL de meio de cultura TSB, previamente aquecido a 37 °C, permanecendo sob agitação de 200 rpm a 37 °C, até atingir a densidade óptica a 600 nm (D.O) entre 0,2 e 0,4 aproximadamente de 1 a 2 horas de cultivo). Após atingir a D.O desejada, a cultura de células foi dividida em 4 tubos do tipo Falcon 50 mL e submetido à centrifugação a 5.204 x g, por 10 minutos, a 4 °C, para coleta das células. O sobrenadante foi descartado e adicionaram-se 1,5 mL de tampão de eletroporação

(250 mM de sacarose; 1 mM de $MgCl_2$; 1 mM de Hepes; 10% de glicerol, esterilizado por filtração) gelado. Os sedimentos celulares foram ressuspensos de maneira suave, evitando movimentos bruscos com os tubos. Após transferir a suspensão celular para tubos de 1,5 mL, as células foram novamente centrifugadas a $3.824 \times g$ por 5 minutos a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ e o sobrenadante foi descartado. A lavagem com tampão de eletroporação foi repetida por mais 4 vezes sob as mesmas condições descritas acima. Ao final da quarta lavada, as células foram ressuspensas em 1,3 mL de tampão de eletroporação gelado e aliqüotadas 50 μL em tubos de 1,5 mL. Logo em seguida, realizou-se a eletroporação dessas células com o DNA de interesse. O restante foi armazenado a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ para uso futuro.

3.3 Transferência do transposon para as células eletrocompetentes

Em 50 μL de células eletrocompetentes, foi adicionado 1 μL do complexo transposon/transposase fornecidos junto com o conjunto de reagentes : :TNTM <KAN-2> Insertion Kit fornecido (Epicentre). Essa mistura foi transferida para cubeta de 1 mm (BioRad) previamente resfriadas. Rapidamente, a mistura foi submetida a eletroporação em eletroporador Genepulser (Bio-Rad) ajustado para 200 ohms, 25 μF , 2,0 kV. Imediatamente após aplicado o pulso elétrico, adicionou-se 950 μL de tampão de recuperação (1 X TSB; 250 mM sacarose; 5mM $MgCl_2$ $MgSO_4$) dentro da cubeta, misturado, e transferidos para tubos de 1,5 mL. Depois de 2 horas a 200 rpm a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, uma alíquota de 100 μL e outra de 10 μL foi semeada em duas placas de Petri, individualmente, com meio de cultura BHI sólido suplementado com canamicina (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Essas placas foram incubadas a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ por aproximadamente 16 horas, até que as colônias pudessem ser visualizadas.

3.4 Constituição da biblioteca de mutantes

Os clones que se multiplicaram em meio de cultura com canamicina foram coletados individualmente, com o uso de palitos de dente previamente autoclavados e transferidos para placas de 96 poços do tipo Costar, contendo 100 μ L de meio de cultura BHI líquido. Após multiplicação das células por 3 horas, foram transferidos 10 μ L para placa “Deepwell” contendo 1 mL de meio de cultura BHI líquido suplementado com canamicina (10 μ g/mL) e procedida a multiplicação das células que por aproximadamente 16 horas, a 200 rpm, a 30 °C. O restante ficou na placa, recebeu 100 μ L de glicerol 40% e foram homogeneizados e estocados em freezer – 80 °C.

3.5 Extração de DNA genômico dos mutantes

Para a realização da extração de DNA dos clones foi utilizado o método de MARMUR (1961) com modificações. Os clones mutantes de *B. thuringiensis* foram multiplicados em tubos Falcon de 15 mL contendo 3 mL de meio de cultura BHI com canamicina e incubados por 16 horas a 30 °C, sob agitação de 200 rpm. Em seguida, todo o conteúdo foi colocado em tubos eppendorf de 2,0 mL e centrifugado por 3 minutos a 10.621 x g, em temperatura ambiente, para obtenção do precipitado bacteriano. Este precipitado foi ressuscitado em 0,5 mL de solução salina [0,15 M NaCl; 0,1 M EDTA, (pH 8,0)], acrescentado 60 μ L de lisozima (20 mg/mL) e mantidos em banho a 37°C por 1 hora. Em seguida, foi adicionado dodecil sulfato de sódio 25% (SDS), agitando-se suavemente a preparação por 5 minutos. Acetato de sódio 2,5 M foi adicionado à preparação até atingir a concentração final de 1 M. As desproteínações foram feitas utilizando-se clorofórmio/álcool-isoamílico (24:1 V/V), sob centrifugação a 12.851 x g por 10 minutos a 4 °C. Aos sobrenadantes coletados foram adicionados dois volumes de etanol absoluto gelado, coletando-se o precipitado por centrifugação a 12.851 x g por 10 minutos, foram adicionados 50 μ L de TE [10 mM Tris HCl (pH 7,4) 1 mM EDTA] e 5 μ L de RNase (10 mg/mL), mantendo-se por 1 hora a 37 °C, em banho-maria. A suspensão foi submetida a um tratamento com clorofórmio/álcool-isoamílico,

seguinto-se a reprecipitação do DNA com etanol absoluto, sendo posteriormente ressuspendido em TE e estocado a - 20 °C até o momento do uso.

As amostras de DNA genômico foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8%, em tampão TEB [Tris 89 mM, Ácido Bórico 89 mM e EDTA 2,5 mM, (pH 8,3)], contendo brometo de etídeo em uma força de 70 V por 2 h. Ao final da eletroforese, a imagem do gel foi visualizada sobre luz U.V e fotodocumentada (Gel Doc 2000 – Bio-Rad).

Foi feita extração de DNA genômico de acordo com WILSON (1987), com o intuito de testar qual dos protocolos dariam um produto melhor para a realização deste trabalho. Esta extração consiste em: depois de centrifugar as células bacterianas por 5 minutos a 10.621 x g e descartar o sobrenadante, 507 µL de TE e 60 µL de lisozima (20 mg/mL) foram adicionados ao precipitado e após ressuspende o pellet, manteve-se a placa em banho-maria a 37 °C por 30 minutos. Em seguida, adicionaram-se 30 µL de SDS 10% e 3,0 µL de proteinase k (20 mg/mL), mantendo-se em banho-maria por mais 30 minutos a 37 °C. Passado os 30 minutos, 100 µL de NaCl 5,0 M foram adicionados a cada amostra e logo após homogeneização, 80 µL de CTAB 10% + NaCl 0,7 M foram acrescentados a cada amostra, mantendo-se em banho-maria a 65 °C por 10 minutos. Depois da lise celular, a suspensão recebeu 700 µL de clorofórmio álcool-isoamílico e após homogeneização, foi submetida à centrifugação por 5 minutos a 10.621 x g. O sobrenadante foi transferido para uma nova placa, e igual volume de clorofórmio álcool-isoamílico, foi adicionado, seguindo-se uma centrifugação a 10.621 x g por 5 minutos. Tomando cuidado para não transferir contaminantes, 200 µL do sobrenadante foram transferidos para outra placa e acrescentado igual volume de isopropanol gelado. Após 20 minutos a - 20 °C, as amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 12.851 x g, a 4 °C. Finalmente, após total eliminação do etanol, 40 µL de TE contendo RNase (10 mg/mL) foram adicionados a cada pellet de ácido nucléico e as amostras submetidas a 37 °C por 1 hora em banho-maria.

Além do dessas duas metodologias de extração, uma outra metodologia foi adaptada para a extração de DNA genômico, em placas de 96 cavidades, este protocolo é baseado no método de extração segundo WILSON (1987). Nesta metodologia, os clones mutantes de *B. thuringiensis* foram multiplicados em placas de

96 cavidades contendo 1 mL de meio de cultura BHI suplementado com canamicina (10 µg/mL) e incubados por 16 horas a 30 °C, sob agitação contínua de 200 rpm. As amostras foram submetidas à centrifugação por 10 minutos a 3.220 x g, em temperatura ambiente. Após descartar o sobrenadante, 507 µL de TE e 60 µL de lisozima (20 mg/mL) foram adicionados ao precipitado. Após ressuspender o pellet nessa solução, manteve-se a placa em banho-maria a 37 °C por 30 minutos. Em seguida, adicionaram-se 30 µL de SDS 10% e 3,0 µL de proteinase k (20 mg/mL), mantendo-se em banho-maria por mais 30 minutos a 37 °C. Passado os 30 minutos, 100 µL de NaCl 5,0 M foram adicionados a cada amostra e logo após homogeneização, 80 µL de CTAB 10% + NaCl 0,7 M foram acrescentados a cada amostra, mantendo-se em banho-maria a 65 °C por 10 minutos. Depois da lise celular, a suspensão recebeu 700 µL de clorofórmio álcool-isoamílico e após homogeneização, foi submetida à centrifugação por 15 minutos a 3.220 x g. O sobrenadante foi transferido para uma nova placa, e igual volume de clorofórmio álcool-isoamílico, foi adicionado, seguindo-se uma centrifugação a 3.220 x g por 15 minutos. Tomando cuidado para não transferir contaminantes, 200 µL do sobrenadante foram transferidos para outra placa e acrescentado igual volume de isopropanol gelado. Após 20 minutos a – 20 °C, as amostras foram centrifugadas por 45 minutos a 3.220 x g, a 4 °C. Finalmente, após total eliminação do etanol, 40 µL de TE contendo RNase (10 mg/mL) foram adicionados a cada pellet de ácido nucléico e as amostras submetidas a 37 °C por 1 hora em banho-maria. Tal qual na metodologia anterior, as amostras de DNA foram analisadas por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8%, contendo brometo de etídeo 0,05 µg/mL, comparando o padrão das amostras extraídas com outras cujas qualidade e concentração são conhecidas.

3.6 Confirmação da ocorrência de mutação no genoma de *Bacillus thuringiensis*

A confirmação da ocorrência de inserção do transposon no genoma de *B. thuringiensis*, se deu por duas técnicas: reação da polimerase em cadeia (PCR) e hibridização de ácidos nucleicos. Para isso, foi desenhado um par de oligonucleotídeos

iniciadores baseado na seqüência do transposon disponibilizada no protocolo do fabricante.

3.6.1 Reação da Polimerase em Cadeia

Com base na seqüência do transposon, um oligonucleotídeo foi produzido com homologia à região de reconhecimento pela transposase (“mosaic ends”). Essa região é composta por 19 pb presente nas extremidades do transposon e é requerida para a transposição. Uma vez que essa seqüência está presente nas extremidades do transposon de maneira invertida, em único oligonucleotídeo é suficiente para amplificar a seqüência de nucleotídeos do transposon.

Assim, o iniciador Tn5_FR 5'- GTCTCTTATACACATCTCAACC-3', foi utilizado nas reações, que foram compostas por 30 ng de DNA genômico, 200 µM de uma solução de dNTPs, 2,0 mM de MgCl₂, 0,5 µL do iniciador (5,0 pmoles), 1,0 U da enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), solução tampão para reação de PCR (equivalente a 10% da reação) e água bi-destilada previamente esterilizada suficiente para completar o volume para 20 µL. Essa reação foi submetida a um programa de amplificação composto por um passo inicial de desnaturação a 94 °C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos compostos por uma etapa de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, uma para pareamento do iniciador a 50 °C por 30 segundos e uma etapa para polimerização da seqüência a 72 °C por 1 minuto. Ao final dos 35 ciclos, seguiu-se uma etapa extra de polimerização a 72 °C por 7 minutos, após o qual os tubos foram mantidos a 4 °C até a retirada do termociclador. Após a eletroforese das amostras, a observação de um fragmento de DNA amplificado de tamanho igual a 1217 pb confirma a presença do transposon no genoma da bactéria.

3.6.2 Análise de Southern Blot

Além da PCR, utilizou-se também hibridização de ácidos nucleicos para confirmar a inserção do transposon no genoma de *B. thuringiensis*.

Aproximadamente 10 µg de DNA genômico de cada um dos mutantes, foram clivados com a enzima de restrição *EcoRI* por 2 horas a 37 °C, essa enzima não possui sítio de clivagem no transposon. A reação de clivagem foi realizada em um volume final de 50 µL, contendo 10 µg de DNA, 5,0 µL de tampão da enzima (equivale a 10% da reação), 1,0 µL da enzima (5.000 U) e água bi-distilada previamente esterilizada suficiente para completar o volume para 50 µL. As amostras devidamente clivadas foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1% (tampão 1 x TAE), por 12 horas a 25 volts e em seguida, corado com brometo de etídeo e fotodocumentado. Na seqüência o gel, foi depurinado em HCl (11 mL de HCl; 989 mL de água destilada) sob leve agitação por 10 minutos. Em seguida, as amostras foram submetidas a uma solução de desnaturação (87,66 g de NaCl; 20 g de NaOH, dissolvidos em 1000 mL de água destilada), sob leve agitação por mais 30 minutos. Após esses procedimentos, montou-se um sistema de capilaridade para que ocorresse a transferência do DNA para membrana de náilon (Hybond N+, Amersham Biosciences), utilizando-se a mesma solução de desnaturação acima como veículo. Ao final do período de transferência do DNA para a membrana, esta foi lavada em uma solução 2 X SSC (17,53 g de NaCl; 8,72 g de citrato de sódio completando para 1000 mL de água destilada) e submetida a 80 °C por 2 horas para a completa fixação do DNA à membrana. Finalmente, a membrana foi submetida aos processos de pré-hibridização, hibridização, pós-hibridização e detecção, conforme as recomendações do fabricante do conjunto de reagentes DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter kit II (Roche), utilizado nesta fase pelas amostras marcadas na membrana e fotodocumentados.

3.6.2.1 Preparo da sonda

O mesmo oligonucleotídeo iniciador utilizado nas PCR (seção 3.6.1), foi utilizado em uma reação de amplificação, nas mesmas condições descritas anteriormente, utilizando como DNA molde um vetor carregando a seqüência do transposon. Este produto foi marcado com digoxigenina (DIG), utilizando-se o conjunto de reagentes DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter kit II (Roche), seguindo as instruções do fabricante. Essa análise, além de confirmar a inserção do transposon, também pode indicar se ela é única e se a inserção foi aleatória, o que pode ser inferido pela detecção de fragmentos de diferentes tamanhos no filme raio-X.

3.7 Quantificação da produção de esporos produzidos pelos mutantes

A partir dos estoques em freezer – 80 °C, os clones mutantes foram colocados para se multiplicar em meio de cultura BHI com canamicina (10 µg/mL) sob agitação de 200 rpm por 12 horas em placa de 96 cavidades. Em seguida, transferiu-se 20 µL para placas de Petri com meio de cultura NA (Nutriente Agar), submetendo-se à multiplicação por 5 dias em estufa a 30 °C. Toda a massa bacteriana da placa de Petri foi transferido para 10 mL de solução espalhante (500 mL de água + 25 µL de tween) em tubos falcon de 15 mL. Este conteúdo foi diluído 10 vezes e 150 µL dessa solução diluída foram colocados na câmara de Neubauer e procedida à contagem dos esporos. Caso necessário, a grande quantidade de esporos, a solução inicial foi diluída 100 vezes, ao invés de 10 vezes, para possibilitar a contagem dos esporos. O mesmo procedimento foi realizado com o isolado selvagem, exceto a adição de canamicina ao meio de cultura. Esse experimento foi repetido três vezes de maneira independente.

Os testes estatísticos foram realizados no programa estatístico R (www.r-project.org) e as diferenças estatísticas foram testadas por meio do método não-paramétrico Krustal-Wallis. Um gráfico do tipo “Box-plot” foi constituído para permitir uma análise visual dos dados e para a identificação das diferenças entre os mutantes e destes para o isolado selvagem.

3.8 Bioensaio realizado com lagartas de *Spodoptera frugiperda*

3.8.1 Delineamento experimental

O bioensaio foi realizado com lagartas de *Spodoptera frugiperda*, cedidas pelo Laboratório de Ecologia Aplicada do Departamento de Fitossanidade da FCAV-UNESP. Para a realização do bioensaio cada isolado bacteriano foi cultivado em meio de cultura NA (Nutrient Agar) a 30°C por 7 dias. Nestas condições eles apresentaram uma boa quantidade de esporos juntamente com os cristais.

A dieta das lagartas de *S. frugiperda* foi preparada com feijão (150 g), germe de trigo (120 g), proteína de soja (60 g), caseína (60 g), levedura de cerveja (75 g), ágar (45 g), ácido ascórbico (7,92 g), ácido sórbico (4 g), tetraciclina (248 mg), nipagin (6,6 g), formol 10% (7 mL) e água previamente aquecida (2.400 mL). Todos esses ingredientes foram batidos em um liquidificador e distribuídos em forma esterilizada, permanecendo no fluxo laminar até solidificar. Depois de cortada em cubos de 1cm³, a dieta foi esterilizada em luz germicida e conservada na geladeira até o momento do uso.

Decorrido o período de crescimento dos isolados bacterianos, estes foram transferidos para tubos falcon contendo água esterilizada com tween 20 (0,005% v/v), para que fosse realizada a contagem dos esporos. Em seguida, a contagem dos esporos foi feita através da câmara de Neubauer. Esta câmara possui o desenho de uma grade que contém 1 quadrante localizado no centro da câmara. Este quadrante possui 25 quadrados menores, com uma área de 0,1 mm². Ao ser colocada a lamínula de vidro na câmara de Neubauer, obtém-se altura de 0,1 mm. A capacidade de volume é, portanto, de 0,1 mm x 0,1 mm² = 0,1 mm³ (0,1 mm³ = 0,0001 cm³ = 0,0001 mL ou 10⁻⁴ mL). Esta medida padronizada possibilitou a quantificação de esporos. Para isso foi contado todos os esporos localizados dentro dos 5 quadrados menores (na diagonal) e em seguida, o número total de esporos obtidos nos 5 quadrantes foi dividido por 5 (média) e multiplicado por 25 (número total de quadrados) e novamente este resultado foi multiplicado pelo valor da diluição realizada, que neste caso foi 1 x 10⁻². Ao final, o valor encontrado é multiplicado por 1 x 10⁴/mL (ordem de grandeza da câmara).

Em seguida, uma suspensão bacteriana foi preparada em uma concentração de 3×10^8 esporos/mL, a qual foram colocadas sobre as dietas. Após a absorção da suspensão bacteriana pela dieta, esta foi colocada em bandejas contendo 32 células cada, juntamente com lagarta neonatas de *S. frugiperda*. O preparo da testemunha foi realizado da mesma maneira com a dieta mergulhada em água destilada.

Para cada isolado de *B. thuringiensis*, foram realizadas quatro repetições com trinta e dois insetos. Após 24 h do início do ensaio, foi realizada a primeira leitura de mortalidade até o 7º dia a partir da inoculação da bactéria e foi realizada a quantificação de lagartas mortas. Os tratamentos foram avaliados nos períodos de 7 dias a partir da inoculação por meio da quantificação de lagartas mortas pela ação da bactéria *B. thuringiensis*.

3.9 Extração de proteínas Cry

Os clones mutantes, juntamente com o isolado selvagem, foram multiplicados em meio BHI sólido com canamicina durante 16 horas. Depois foram transferidos para 50 mL de meio NA (Nutrient Agar) adicionado canamicina e permaneceu em agitação por 7 dias para total esporulação.

Após o período de esporulação os clones foram centrifugados a $5.930 \times g$ por 20 minutos a 4°C . O sedimento formado foi lavado duas vezes com 20 mL de NaCl 0,5 M e centrifugado a $5.930 \times g$ 4°C por 20 minutos, seguido de duas lavagens com água destilada gelada a 4°C nas mesmas condições de centrifugação. O sedimento foi ressuspenso em 1 mL de tampão (10 mL de tampão fosfato pH 8,0: 0,2 M NaH_2PO_4 + 0,2 M de NaHPO_4 + 10 mL de NaCl 5 M + q.s.p 100 mL), adicionando-se 30 μL de lisozima e 10 μL de DNase, permanecendo incubadas a 37°C por 30 minutos. Em seguida a suspensão foi sonicada 3 vezes por 60 segundos cada uma (com pausa de 10 segundos cada sonicação), para o rompimento de possíveis células íntegras e a liberação dos cristais proteicos. A proteína foi armazenada em freezer a -20°C até o momento do uso.

3.9.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE

Uma amostra de proteína de 100 μL foi preparada a partir da adição de 10 μL da suspensão de proteína, 40 μL de água estéril, mais 50 μL do tampão de amostra (constituído de 62 mM Tris-HCl pH 6,8; 4% SDS; 20% Glicerol; 5% β -mercaptanol e 0,02% de Azul de bromofenol). Essa preparação foi aquecida por 5 minutos a 100 $^{\circ}\text{C}$ e mantida em gelo até o momento da aplicação no gel.

O gel de separação das proteínas foi feito conforme protocolo de LAEMMELI (1970) e a preparação do gel de poliacrilamida consiste em duas concentrações: um gel inicial, de empilhamento, a 5% e um gel posterior, de separação, constituído de 8% de acrilamida. A cuba (Sigma) foi cuidadosamente preenchida com tampão (0,192M glicina, 0,025M Tris e 0,1% SDS) e as amostras foram submetidas a 30 mA por aproximadamente 4 horas.

Após o término da eletroforese, o gel foi fixado com 40% de metanol, 10% de ácido acético glacial e azul de comassie (0,1%) por aproximadamente 14 horas. Seguido de descoloração em 40% de metanol e 10% de ácido acético por 4 horas.

4 RESULTADOS

4.1 Produção de células eletrocompetentes

Inicialmente, fez-se necessário realizar testes de sensibilidade ao antibiótico canamicina, pois o transposon possui o gene de resistência a canamicina. Após testar cinco concentrações, 10, 20, 30, 40 e 50 µg/mL de canamicina em meio de cultura, verificou-se que os dois isolados em estudo são sensíveis a uma concentração mínima deste antibiótico, pois em qualquer uma dessas concentrações, não houve multiplicação dos isolados selvagens. Desse modo, optou-se por utilizar 10 µg/mL de canamicina no meio de cultura seletivo.

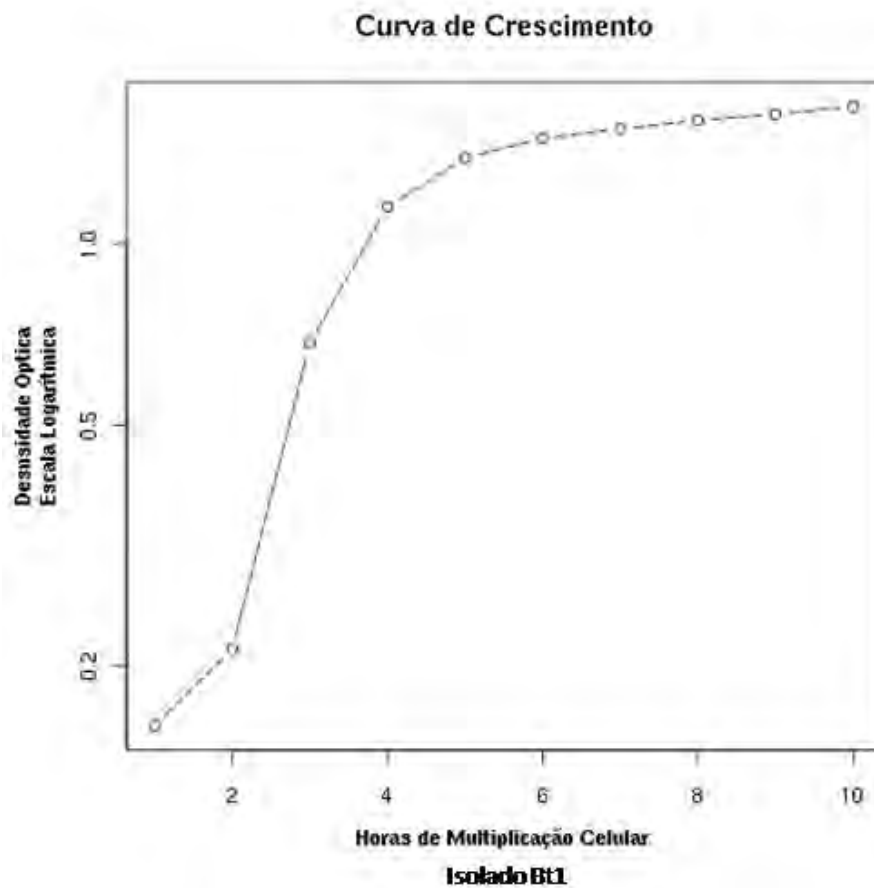
Antes de iniciar a produção de células eletrocompetentes de *B. thuringiensis*, efetuou-se uma busca na literatura a fim de encontrar um protocolo já estabelecido para este propósito. No entanto, poucos estudos nesse sentido foram encontrados e pela falta de padronização, duas metodologias descritas para *B. thuringiensis*, metodologias 1 e 2 (vide seção Material e Métodos), foram testadas sem sucesso, ou seja, em nenhuma das tentativas foi o transposon inserido nas células eletrocompetentes.

Em face desses resultados, uma nova consulta à literatura foi realizada buscando métodos desenvolvidos para outras espécies de *Bacillus*. Assim, a metodologia 3 (vide seção Material e Métodos), baseado em protocolo desenvolvido para *B. cereus* (TURGEON et al., 2006), com pequenas modificações, produziu resultados excelentes.

Contudo, a padronização do protocolo de produção de células eletrocompetentes de *B. thuringiensis* demandou tempo e diversos testes. Um primeiro problema foi com relação a D.O ideal para a produção das células. Alguns trabalhos encontrados na literatura citavam uma D.O igual a 2,0 como sendo a ideal para *B. thuringiensis*, mas nos isolados em estudo, valor igual a esse não foi encontrado em nenhum dos pontos avaliados durante 10 horas (Tabela 1 e Figuras 1 e 2).

Tabela 1. Densidade óptica (D.O) de dois isolados de *B. thuringiensis* ao longo de 24 horas

	1h	2h	3h	4h	5h	6h	7h	8h	9h	10h	24 h
Bt1	0,15	0,21	0,68	1,15	1,38	1,49	1,55	1,60	1,64	1,68	1,97
Bt2	0,06	0,26	0,56	1,23	1,39	1,45	1,49	1,52	1,54	1,58	1,77

**Figura 1.** Curva de crescimento do isolado Bt1 ao longo de 10 horas de multiplicação.

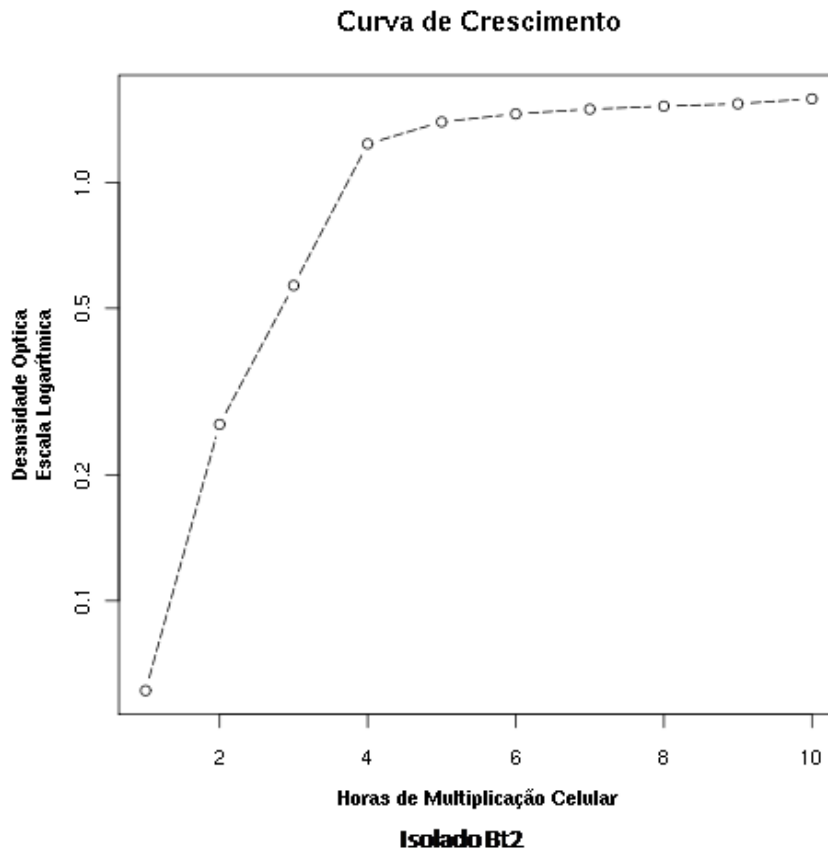


Figura 2. Curva de crescimento do isolado Bt2 ao longo de 10 horas de multiplicação.

Depois de 4 h de crescimento sob agitação de 200 rpm a 30 °C, percebe-se uma fase mais lenta de multiplicação, indicando o início da fase estacionária. Depois de 24 horas de multiplicação obteve-se os resultados de 1,970 e 1,772 para Bt1 e Bt2 respectivamente, demonstrando que uma D.O igual a 2,0 seria de difícil obtenção e que, mesmo atingida, as células estariam numa não propícia à competência. Portanto, com base no protocolo desenvolvido para *B. cereus* (TURGEON et al., 2006) e nos resultados das curvas de crescimento (Figuras 1 e 2), decidiu-se produzir células competentes de *B. thuringiensis* a partir de cultura de células exibindo uma D.O entre 0,2 e 0,4. é importante destacar que essa D.O, entre 0,2 e 0,4, foi obtida entre 2 e 3 horas (Figura 1 e 2), tal qual o obtido para *B. cereus* (TURGEON et al., 2006), um grande indicativo de que nossos experimentos foram adequadamente executados.

4.2 Problemas encontrados

Mesmo todos esses testes feitos com o isolado Bt2, não foi possível a continuação do trabalho com este isolado devido ao fato de não ter ocorrido a transformação. Foram testados vários parâmetros com a produção de células eletrocompetentes, como a variação da voltagem aplicada na transformação, o tempo de recuperação das células após a eletroporação. E em nenhum dos casos houve o surgimento de células transformadas, sendo que em algumas placas até multiplicavam alguns clones, mas na confirmação da inserção do transposon através da PCR, não foi encontrado clone positivo. Diante disto, resolvemos dar continuidade apenas com o isolado Bt1, em que já havia sido confirmada a inserção do transposon.

4.3 Extração de DNA genômico

Após a padronização da produção de células eletrocompetente, fez-se necessário estabelecer um protocolo de extração de DNA, pois o protocolo desenvolvido por MARMUR (1961) apresentou baixo rendimento, além de impurezas, pois o DNA obtido não era clivado pela enzima *EcoRI* (Figura 3). Assim, testou-se o protocolo desenvolvido por WILSON (1987), com algumas modificações, como o uso de lisozima e de RNA, por exemplo, o qual produziu grande quantidade de DNA e de ótima qualidade para as nossas necessidades (Figura 3).

Uma vez que o trabalho prevê analisar uma grande quantidade de mutantes, a extração de DNA deveria ser otimizada. Portanto, a partir do protocolo desenvolvido por LAIA (2009), para extração de DNA de *Xanthomonas axopodis* pv. *citri* em placas de 96 cavidades e do protocolo desenvolvido por Wilson (1987), foi padronizado um protocolo para extração de DNA genômico de *B. thuringiensis* em larga escala. O DNA extraído também teve qualidade e quantidade ótimas para o propósito desse estudo (Figura 4).

A extração de DNA foi bem sucedida com o método de extração segundo WILSON (1987), as amostras ficaram com um DNA mais concentrado (figura 4). Este protocolo deixou o DNA livre de impurezas e para a realização do restante do trabalho

foi mais adequado, pois o passo seguinte é a restrição com a enzima *EcoRI*. Depois da extração, o DNA genômico foi quantificado por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

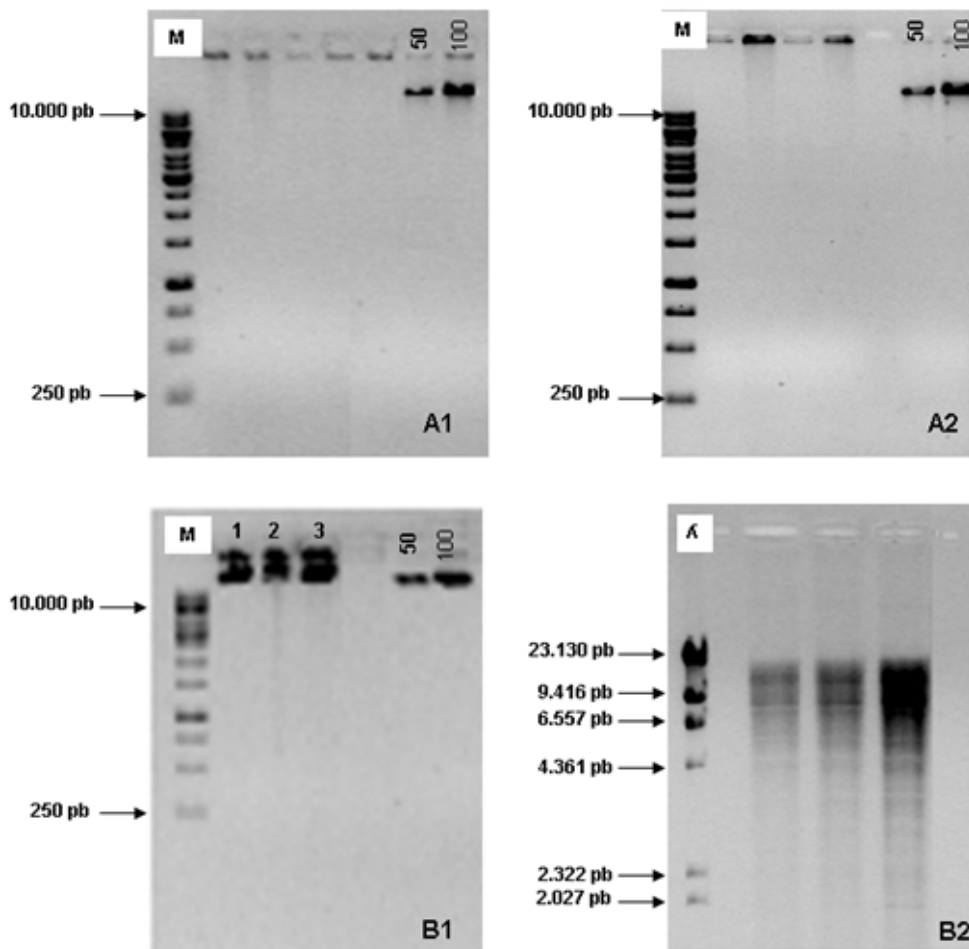


Figura 3. Comparação dos dois protocolos de extração de DNA genômico e a clivagem com a enzima *EcoRI*. “A1”= DNA total extraído pelo método de Marmur, “A2”= DNA extraído pelo método de Marmur digerido com a enzima *EcoRI*, “B1”= DNA extraído pelo método “Preparation of Genomic DNA from Bacteria” (WILSON, 1987), “B2”= digestão de 5 μg de DNA extraído pelo método segundo Wilson, M= 1 kb DNA Ladder Gene Ruler™, λ = DNA do fago Lambda clivado com *Hind* III, 1= clone A1, 2= clone A2, 3= clone A3, 50= 50 ng/μL de DNA de lambda; 100= 100 ng/ μL de DNA de lambda.

As amostras que não apresentaram DNA são porque não houve crescimento do clone em meio de cultura BHI líquido com canamicina, e isto pode indicar que posteriormente esses clones perderam o transposon.

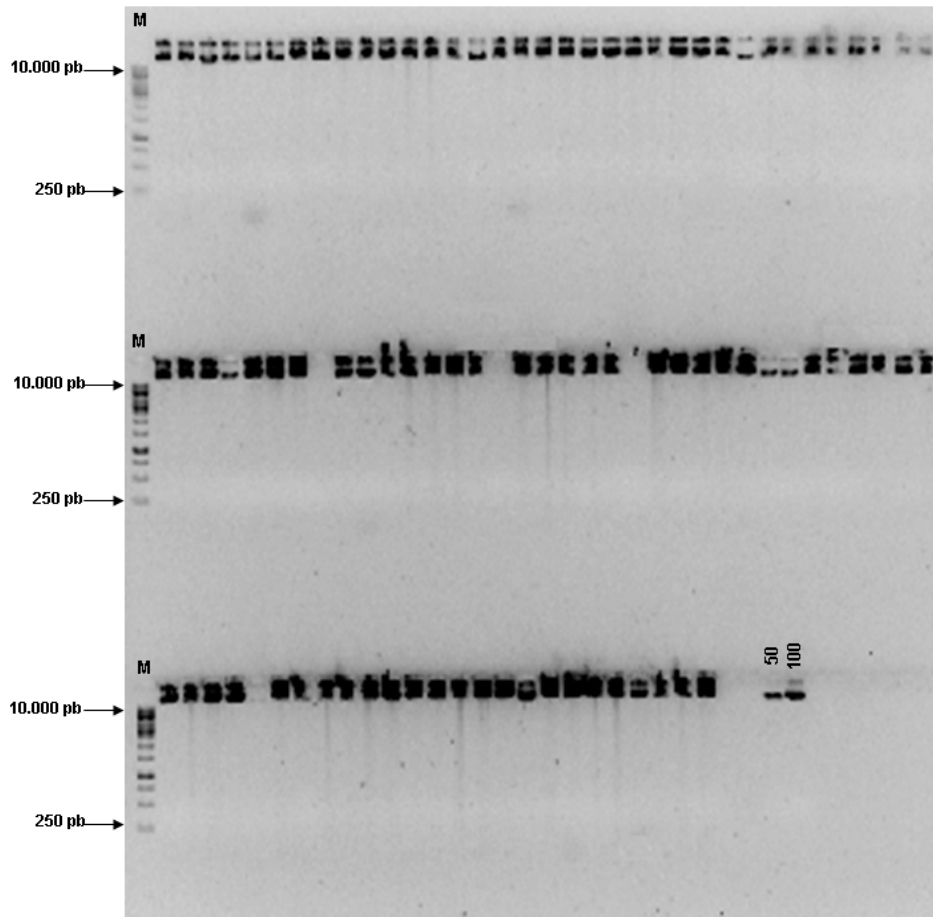


Figura 4. Gel de agarose 0,8% da extração de DNA em placas de 96 cavidades. M= 1 kb DNA Ladder Gene Ruler™, 50= 50 ng/μL de DNA de lambda, 100= 100 ng/μL de DNA de lambda.

4.4 Produção da biblioteca de mutantes de *B. thuringiensis*

Na primeira metodologia utilizada neste trabalho, não foi obtido mutante. O mesmo ocorreu com a segunda metodologia. O emprego do método 3 de transformação propiciou a obtenção de 96 clones mutantes de *B. thuringiensis*,

validando esta metodologia, quanto a competência da célula. Os mutantes estão armazenados em 100 µL de meio de cultura BHI adicionado 100 µL de glicerol (40%) em freezer – 80 °C.

4.5 Confirmação da ocorrência da transformação

Todos os mutantes constantes da biblioteca foram submetidos à técnica de PCR e de Southern Blot para a confirmação da inserção do transposon no genoma.

Para os clones mutantes produzidos a partir de células eletrocompetentes obtidas por meio de métodos 1 e 2 (vide seção Material e Métodos) não foi produzido nenhum produto durante as PCR. Já para a metodologia 3 de produção de células eletrocompetentes, o resultado da PCR (Figura 5) apresentou amplificação positiva (um fragmento de 1217 pb) para 85 clones mutantes. Logo, do total de mutantes obtidos com células competentes produzidas pelo método 3 apenas 11,5% (11 clones) não se confirmaram.

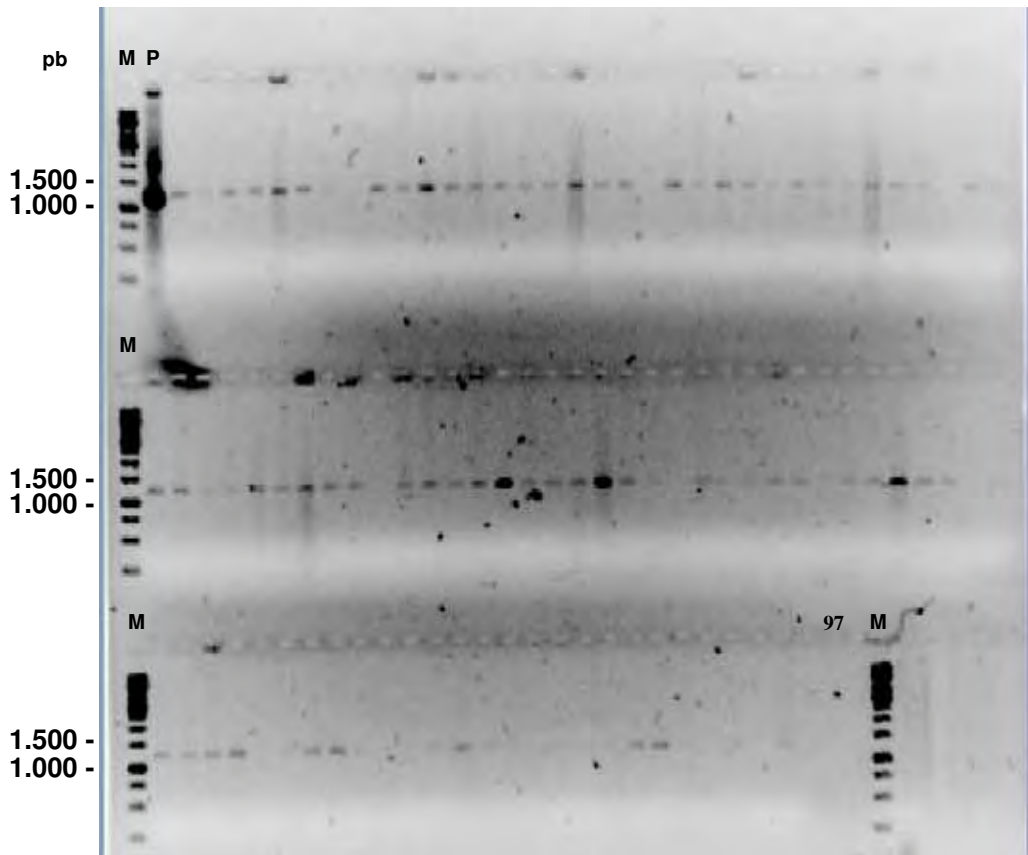


Figura 5. Perfil eletroforético dos produtos de PCR dos 85 clones mutantes de *B. thuringiensis* com o oligonucleotídeo iniciador Tn_FR, de um fragmento de 1.217 pb interno ao transposon Tn5 (Epicentre). M= 1 kb DNA ladder Gene Ruler™, P= controle positivo (Tn5 clonado em plasmídeo pBluescript SKII); 97= controle negativo (água ao invés de DNA molde na reação).

O Southern Blot foi realizado de duas maneiras: com o DNA genômico dos mutantes que foi clivado com a enzima *EcoRI* (Figura 6), separado em gel de agarose e transferido para a membrana de náilon; e também com o produto da PCR do DNA genômico dos mutantes utilizando o iniciador Tn-FR, que foram transferidos para a membrana de náilon. Foi utilizada a enzima *EcoRI* para clivar o DNA genômico dos clones pelo fato desta enzima por não cortar a seqüência do transposon.

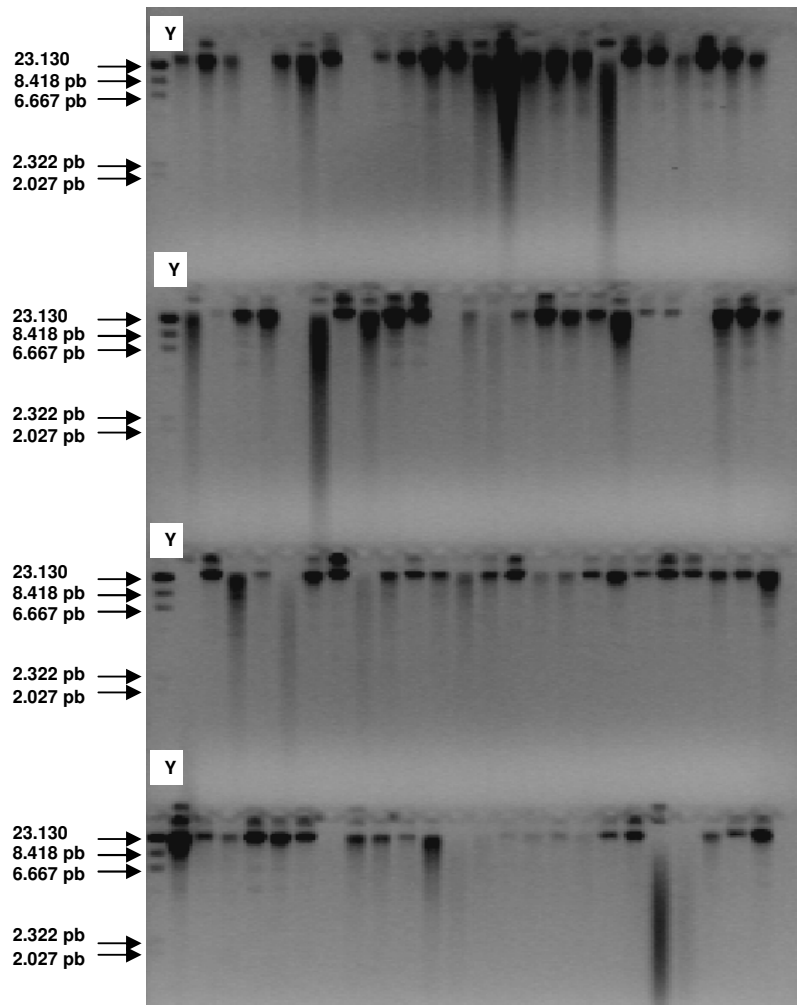


Figura 6. DNA clivado com enzima *EcoRI*. Foi usado como marcador o lambda (primeira canaleta de cada fileira acima).

As hibridizações a partir do produto da PCR confirmaram que as ampliações são realmente parte do transposon (Figura 7). Por outro lado, as hibridizações a partir do DNA genômico não apresentaram boa qualidade e, portanto, não é possível conclusões definitivas a respeito daquelas amostras que não apresentaram sinal esperado (Figura 8). Mas, mesmo com qualidade a desejar, é possível ver alguns clones positivos.

Os resultados da hibridização tanto do DNA quanto da PCR foram feitos com a mesma placa, portanto foram os mesmos clones.

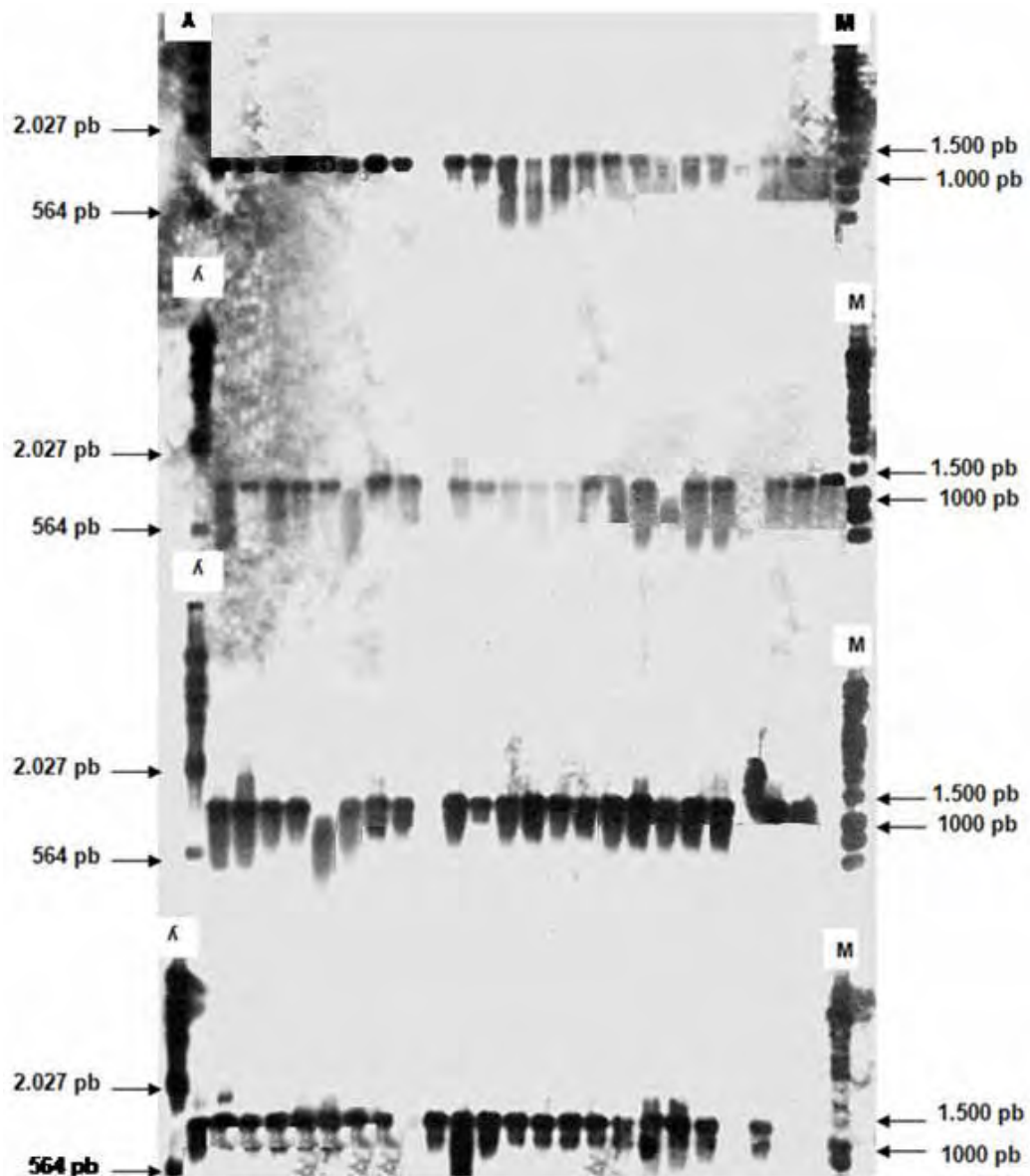


Figura 7. Hibridização do produto da PCR (sequência do transposon) dos clones mutantes de *B. thuringiensis*. M = DNA do fago λ (lambda) clivado com *Hind* III.

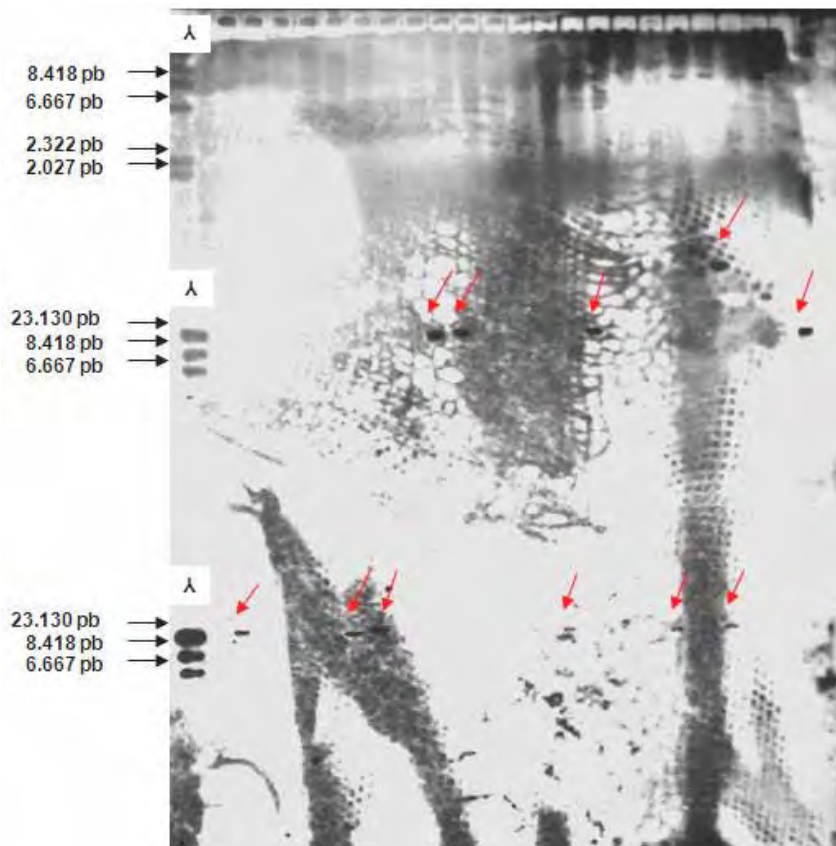


Figura 8. Hibridização dos DNAs dos clones mutantes de *B. thuringiensis*. Foram clivados 10 µg de DNA total. λ = DNA do fago (lambda) clivado com *Hind* III.

4.6 Quantificação da produção de esporos dos mutantes

A produção de esporos pelos mutantes apresentou variância com uma amplitude de 20 a 3000 esporos/mL. Alguns clones produziram uma grande quantidade de esporos, outros produziram uma quantidade bem reduzida e outros que não tiveram grandes variações em relação ao isolado selvagem (Tabela 2 e Figura 9). Alguns dos isolados que tiveram redução, permaneceram com os esporos no interior das células.

Tabela 2. Produção de esporos por mutantes do isolado Bt1 de *B. thuringiensis*

Genótipo	Esporos/mL	Genótipo	Esporos/mL	Genótipo	Esporos/mL
Bt1A1	8400000	Bt1D9	6580000	Bt1G4	12820000
Bt1A1	8000000	Bt1D9	5300000	Bt1G5	9440000
Bt1A1	7000000	Bt1D11	160000	Bt1G5	11420000
Bt1A5	6000000	Bt1D11	280000	Bt1G5	12620000
Bt1A5	4000000	Bt1D11	120000	Bt1G6	3460000
Bt1A5	4600000	Bt1E2	31380000	Bt1G6	2160000
Bt1A9	1400000	Bt1E2	42900000	Bt1G6	2800000
Bt1A9	3800000	Bt1E2	27940000	Bt1H1	14400000
Bt1A9	1800000	Bt1E6	21940000	Bt1H1	13820000
Bt1A12	3000000	Bt1E6	25660000	Bt1H1	19740000
Bt1A12	4000000	Bt1E6	17920000	Bt1H3	15660000
Bt1A12	2800000	Bt1E7	17280000	Bt1H3	17520000
Bt1B9	19480000	Bt1E7	21240000	Bt1H3	15260000
Bt1B9	18340000	Bt1E7	11740000	Bt1H4	14420000
Bt1B9	19340000	Bt1F2	18940000	Bt1H4	10300000
Bt1C1	380000	Bt1F2	19860000	Bt1H4	9640000
Bt1C1	220000	Bt1F2	15680000	Bt1H6	4600000
Bt1C1	240000	Bt1F6	21300000	Bt1H6	4920000
Bt1C2	280000	Bt1F6	23400000	Bt1H6	5220000
Bt1C2	560000	Bt1F6	19660000	Bt1H9	17400000
Bt1C2	220000	Bt1F8	140000	Bt1H9	18960000
Bt1C9	740000	Bt1F8	400000	Bt1H9	13960000
Bt1C9	520000	Bt1F8	280000	Bt1H10	7360000
Bt1C9	220000	Bt1F10	11340000	Bt1H10	7740000
Bt1C10	780000	Bt1F10	11420000	Bt1H10	6420000
Bt1C10	540000	Bt1F10	10840000	Bt1H12	14600000
Bt1C10	1140000	Bt1G1	600000	Bt1H12	15920000
Bt1D3	800000	Bt1G1	400000	Bt1H12	11880000
Bt1D3	1120000	Bt1G1	740000	Bt1	8600000
Bt1D3	1580000	Bt1G4	13500000	Bt1	9740000
Bt1D9	7180000	Bt1G4	19300000	Bt1	10740000

Apesar de visualmente ser possível verificar grande diferença entre isolados, optou-se por realizar um teste estatístico a fim de confirmar a hipótese detectada visualmente. O primeiro passo foi verificar a normalidade dos dados, pré-requisito para as análises paramétricas. Uma distribuição gráfica dos dados (Figura 9) mostra que o conjunto não tem uma distribuição normal. Em sendo assim, aplicou-se o teste de Kruskal-Wallis, um teste não-paramétrico, e verificou-se que há diferenças significativas entre os isolados, quanto a produção de esporos ($p < 0,001$) (Tabela 3).

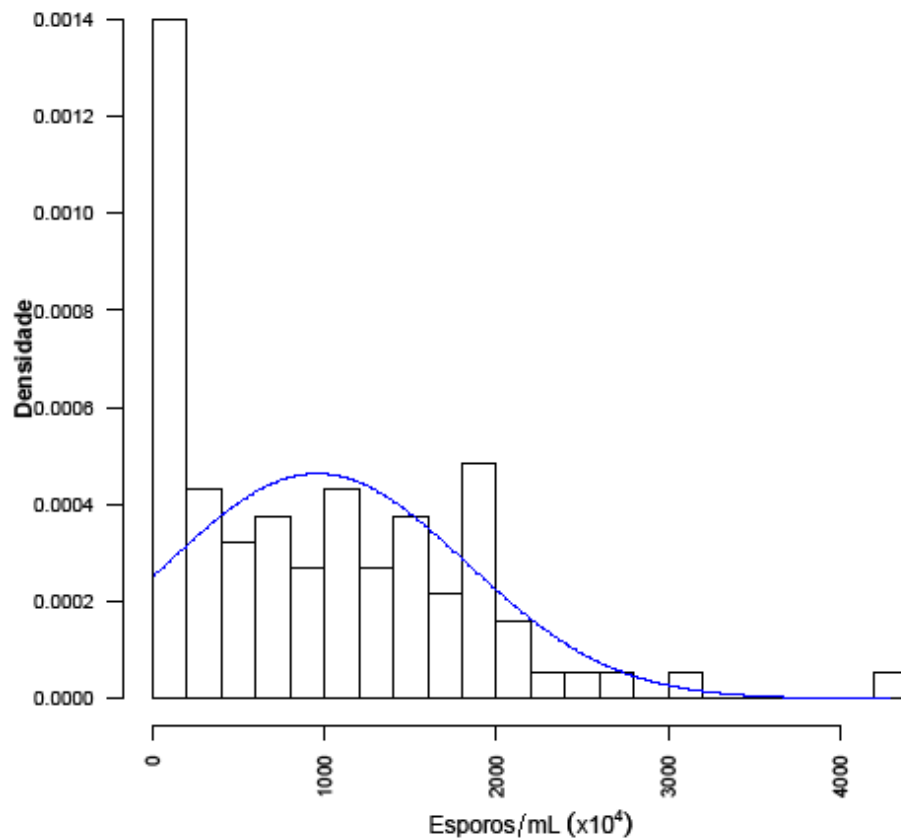


Figura 9. Distribuição de produção de esporos de 30 mutantes e um selvagem do isolado de *B. thuringiensis*. A linha azul representa a curva de distribuição normal dos dados, teórica.

Tabela 3. Resultado do teste de Kruskal-Wallis para a produção de esporos de 30 mutantes e 1 selvagem do isolado Bt1 de *B. thuringiensis*

Kruskal-Wallis chi-squared	df	p-value
89,342	30	8,26E-008

Dentre os 30 isolados, pode-se observar que 9 mutantes produziram menor quantidade de esporos (Bt1A1, Bt1A12, Bt1A5, Bt1A9, Bt1D3, Bt1D9, Bt1G6, Bt1H10, Bt1H6) e 9 produziram maior quantidade de esporos (Bt1E7, Bt1F10, Bt1G4, Bt1G5, Bt1H1, Bt1H12, Bt1H3, Bt1H4, Bt1H9) comparado ao isolado selvagem (Figura 10). Mas, se for considerado o desvio padrão, esses 18 mutantes encontram-se dentro da faixa delimitada pelo desvio padrão (Figura 10). Por outro lado, 7 mutantes (Bt1C1, Bt10C2, Bt1C2, Bt1C9, Bt1D11, Bt1F8 e Bt1G1) tiveram uma produção de esporos menor que o desvio padrão e 5 mutantes (Bt1B9, Bt1E2, Bt1E6, Bt1F2 e Bt1F6) produziram maior quantidade de esporos que o desvio padrão superior (Figura 10).

A morfologia das colônias mutantes era circular e opaca, ou seja, não houve alteração fenotípica detectada.

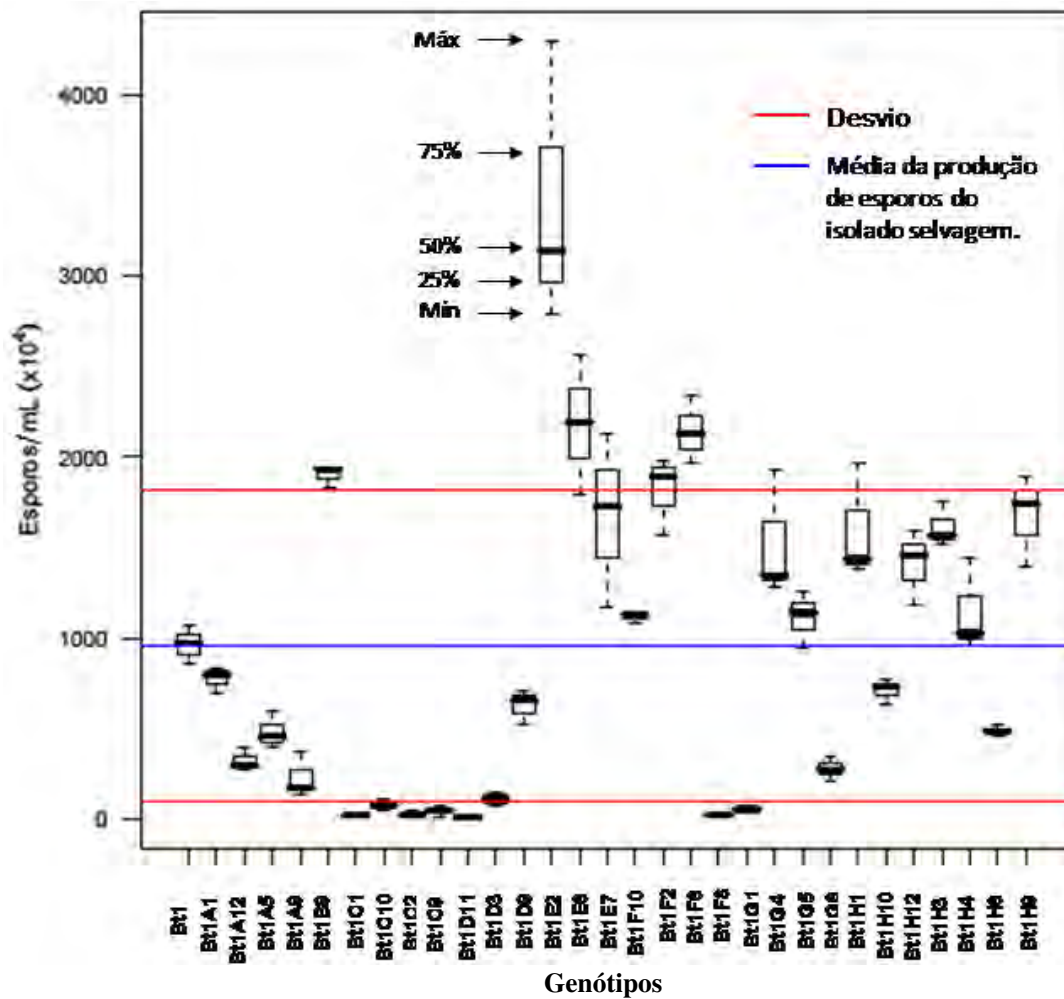


Figura 10. Gráfico do tipo “Box plot” evidenciando a média da produção de esporos dos mutantes comparados ao isolado selvagem. Em cada representação, é mostrado o valor mínimo (mín), 1° quantil (25%), a mediana (50%), 3° quantil (75%) e o valor máximo (max) do conjunto de observações.

4.7 Bioensaios

Para a realização do bioensaio foram escolhidos 5 clones mutantes que produziram mais esporos que o isolado selvagem e 5 clones mutantes que produziram esporos em menor quantidade. Os clones selecionados foram: Bt01B9, Bt1E2, Bt1E6, Bt1F2, Bt1F6, Bt1F8, Bt1G1, Bt1C1, Bt1C9, Bt1D11.

Dentre os mutantes selecionados foi possível encontrar dois que se destacaram no controle da lagarta e mutantes cuja toxicidade foi menor que a do isolado selvagem. Por exemplo, os clones B9 e E2, que tiveram um índice de mortalidade entre 50 e 70% (Figura 11), foram melhores ou igual ao selvagem. Por outro lado, os clones C9 e E2 tiveram um índice de mortalidade igual ao isolado selvagem e os clones F8, E6, C1, F2 e F6 não se diferenciaram da testemunha (Figura 12).

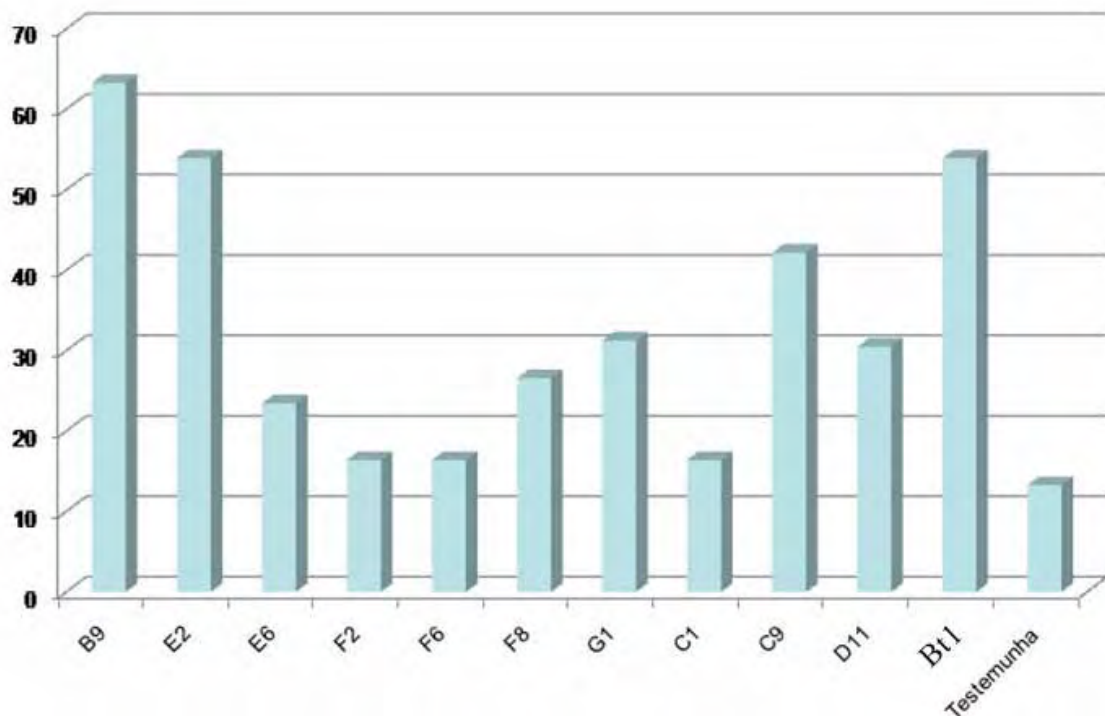


Figura 11. Porcentagem da mortalidade de lagartas de *S. frugiperda* pelos clones mutantes. Controle positivo: Bt1 (isolado selvagem); Controle negativo: Testemunha.

No entanto, ao analisarmos a Figura 12, que mostra os mesmos dados após uma análise estatística, podemos verificar que houve uma divisão dos isolados em cinco grupos, considerando um teste estatístico com nível de significância de 5%. O grupo menos eficiente é composto pelos mutantes E6, C1, F2, F6 e pela testemunha, ou seja,

é possível concluir que a mutação nesses clones os tornaram inerte à praga. Já o grupo mais eficiente é composto pelos clones B9 e E2 e pelo isolado selvagem, ou seja, a mutação nesse dois casos não afetou a sua toxicidade inicial. Mas, se considerarmos que esses dois mutantes produzem muito mais esporos que o isolado selvagem, o fato de manter a toxicidade inicial com uma elevada produção pode ser considerado um enorme ganho.

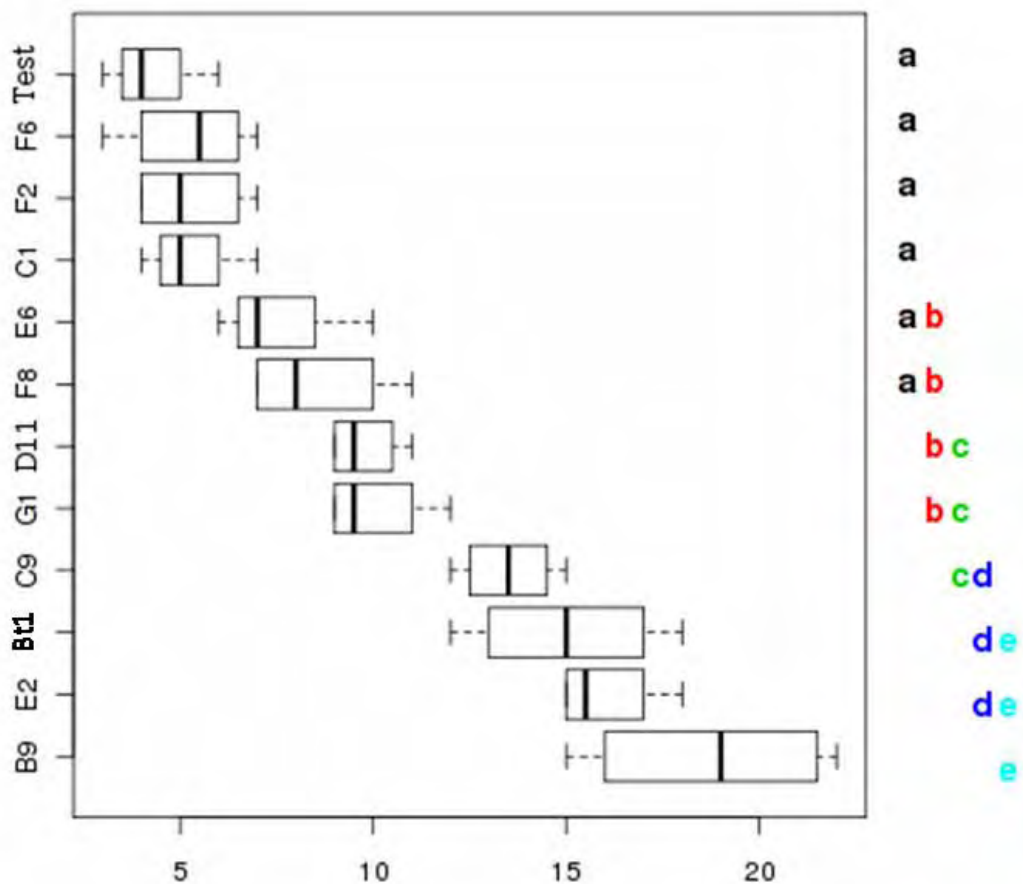


Figura 12. Gráfico de caixas (box plots) mostrando a variação na eficiência em controlar lagartas neonatas de *S. frugiperda* e o resultado da análise estatística. Mutantes seguidos da mesma letra não diferem entre si a 5% de significância pelo teste Tukey HSD.

Outro fato a considerar é que nos dois isolados que tiveram melhores resultados pode ser notado que houve um atraso no desenvolvimento das lagartas de *S. frugiperda*, ou seja, enquanto na testemunha e nos outros isolados, as sobreviventes se transformaram em pupa, as lagartas, remanescentes vivas, controladas pelos clones B9 e E2, continuavam pequenas. Assim, para esses dois mutantes, quando a lagarta não morreu ela também não se desenvolveu. Outro fato a relatar foi que, para alguns clones, houve morte na fase de pupa, mas ainda assim, não obtiveram um número de mortalidade que fosse significativo.

4.8 Extração da Proteína

A proteína cristal produzida pelos clones foram caracterizados por SDS-PAGE da suspensão esporo-cristal (Figura 13). Foi comparado o padrão de bandas de proteínas apresentado pelo isolado Bt1 selvagem com o padrão apresentado pelos clones mutantes, analisando a presença ou ausência de bandas de proteínas. Todos os clones mostraram similaridade com o isolado selvagem nas proteínas entre 55 e 70 kDa, mas diferiram nas proteínas entre 70 e 100 kDa, onde apenas os clones C1, C9 e G1 foram similares a ele. Os valores que indicam aproximadamente 65kDa, podem ser referentes a proteína Cry1Ab, utilizada no controle de lepidópteros-praga.

Nas proteínas entre 100 kDa a 130 kDa, os isolados B9, E2, E6 e F6 apresentaram uma nova proteína diferente do isolado selvagem. Mas, o mais interessante é que somente o mutante B9 tem uma proteína de aproximadamente 100 kDa. Por outro lado, os clones B9, E2 e F6, diferem dos demais e também do selvagem quanto à ausência de proteína entre 35 e 55 kDa. Entre esses três clones existe a diferença que apenas os B9 e E2 atingiram bons níveis de mortalidade, ainda que comparados com o isolado selvagem.

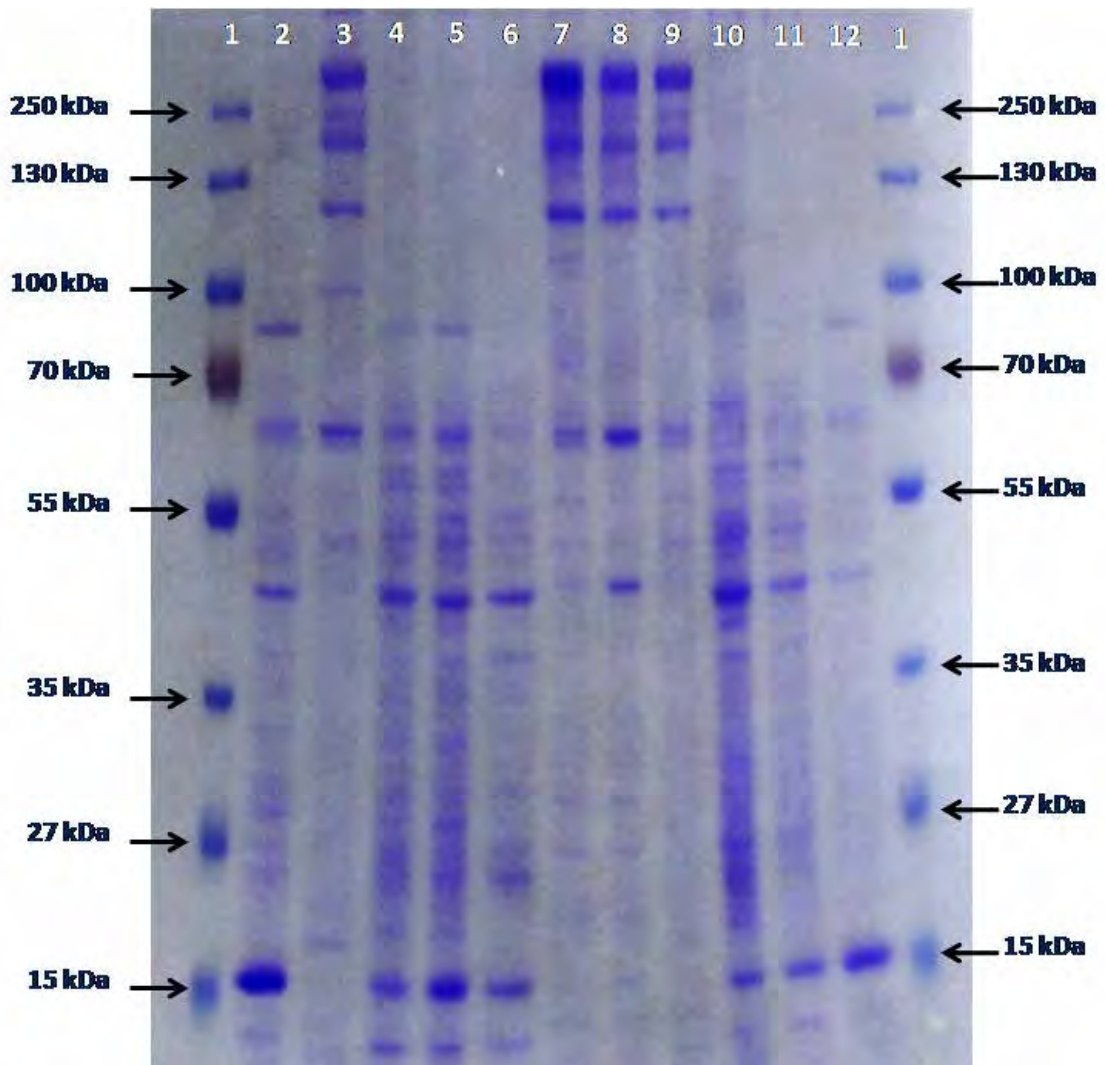


Figura 13. Gel SDS-PAGE 8% dos clones estudados. 1- Marcador molecular em kDa, PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 2- isolado selvagem B1, 3- clone B9, 4- clone C1, 5- clone C9, 6- clone D11, 7- clone E2, 8- clone E6, 9- clone F2, 10- clone F6, 11- clone F8 e 12- clone G1.

5 DISCUSSÃO

Este tipo de mutagênese em diversos organismos requer a otimização de vários parâmetros, incluindo expressão da transposase e marcador de resistência ao antibiótico para a seleção (MAIER et al, 2006).

Na metodologia 1 e 2 para a produção de células eletrocompetentes não houve a inserção do transposon nestes células, comprovada pela hibridização realizada com alguns clones selecionados. Isto pode ser devido ao fato da D.O não estar apropriada, ou seja, as células estavam na fase de crescimento estacionária e por isso não foi obtido um bom número de células viáveis, apesar de diferir dos resultados apresentados por ARANTES (1989), que conseguiu transformantes de *Bacillus thuringiensis* feitos a partir da metodologia 1. A metodologia 2 também difere dos resultados apresentados por MACALUSO e colaboradores (1990), em que conseguiram uma boa quantidade de transformantes.

Já a metodologia 3 foi bem sucedida, isto pode ser pelo fato de ter sido alterada a fase em que foi coletado as células para a produção de eletrocompetentes e também pelo fato de ter usado cloreto de magnésio no tampão de eletroporação. De acordo com BHATTACHARYA (2000), a fase log começa de 3-4 h de incubação e entre 10-12 h alcança a fase estacionária. A esporulação começa de 4-5 h depois do começo da fase log, estes tempos são similares tanto para os mutantes quanto para os isolados selvagens. Outro fator importante para o não funcionamento das células eletrocompetentes (metodologia 1 e 2 do item Material e Métodos), também pode ser pelas células terem sido estocadas, diferentemente do que ocorreu a partir da terceira metodologia de preparação das células, em que as células foram preparadas e imediatamente transformadas.

O método usado na extração de DNA foi adaptado para ser feito em placas "Deepwell" já que havia muitos clones e fazer a extração por tubos Eppendorf seria muito trabalhoso. E para a realização da restrição pela enzima *EcoRI*, foi necessário um protocolo de extração que resultasse em um DNA com menor número de impurezas possível.

Foi incluída neste projeto, a elaboração dos oligonucleotídeos com base na seqüência do transposon para a realização da PCR, pois era esperado um grande número de clones e desta forma adiantaria vários passos usados na hibridização. Depois dos resultados positivos das amplificações, os mutantes foram submetidos a análise de Southern blot, confirmando a presença do transposon no genoma da bactéria. Além disso, tal dado identifica também que houve inserção de apenas um transposon no mutante, o que já se verificou em outros organismos submetidos a mesma técnica. Em *Xylella fastidiosa*, para confirmar o efeito da técnica, foram isolados dez mutantes obtidos por inserção de transposon e submetidos a análise de Southern blot. Os resultados indicaram que as inserções ocorreram como eventos simples e independentes (GUILHABERT et al., 2001). No estudo da eficiência do sistema de metagênese por transposon realizado em *X. campestris* pv. *campestris* e *X. oryzae* pv. *oryzae*, o evento de metagênese também foi analisado por Southern blot mostrando que a quase totalidade dos clones testados apresentaram a inserção aleatória única do transposon (SUN et al., 2003).

A hibridização da PCR (Figura 10) foi importante, pois mostrou que houve inserção do transposon na maioria dos clones coletados diferindo da hibridização com o DNA clivado com a enzima. Isso pode ter ocorrido pelo fato de não ter sido feita a digestão total do DNA.

Como síntese de δ -endotoxinas em isolados de *B. thuringiensis* é dependente do equilíbrio entre: crescimento vegetativo e esporulação; regulamentação da repressão catabólica e necessidades nutricionais (ZOUARI et al. 1998, 2002; ZOUARI e JAOUA 1999; BING-LAN e YEW -MIN 2000). De modo que, era esperado um impacto que poderia ser positivo ou negativo das mutações aleatórias localizados em vários loci sobre o DNA, sendo que, estas mutações poderiam afetar o crescimento e a produção de δ -endotoxinas. Os mutantes que produziram esporos em maior quantidade são de grande importância, devido ao conseqüente aumento na produção de toxinas e à possível melhoria na expressão dos genes *cry*.

Quanto a contagem dos esporos, foi verificado que alguns clones mutantes apresentaram um maior número de esporos que conseqüentemente podem ocasionar um aumento na produção de δ -endotoxinas em comparação com o isolado selvagem.

GHRIBI e colaboradores (2004) identificaram uma alta frequência de mutantes altamente produtivos, chegando a encontrar mutantes cuja produção da proteína cristal foi 59% acima do produzido pelo indivíduo selvagem, no entanto, os locais gênicos afetados não foram identificados. MAHLER e Halvorson (1980) demonstraram que a resistência à eritromicina pode afetar o processo de esporulação em *B. thuringiensis* e em *B. subtilis*, respectivamente.

Nos mutantes onde foram encontrados poucos esporos, geralmente apresentavam muitas células vegetativas e no interior de algumas dessas células foram encontrados esporos. O contrário ocorreu com os mutantes que esporularam mais, ou seja, havia poucas células vegetativas e muitos esporos. Em relação a alteração na produção de esporos, esses resultados apresentados neste trabalho, diferem dos apresentados por FEDHILA e colaboradores (2004), em que as mutações não afetaram significativamente a capacidade de células de *B. thuringiensis* quanto a esporulação (dados não apresentados). Quanto a baixa produção de esporos apresentada por alguns isolados, foi confirmada por BHATTACHARYA e colaboradores (2000), em que foi obtido mutantes que também tiveram deficiência na produção de esporos, mesmo aqueles mutantes que foram considerados altamente tóxicos, comparados ao isolado selvagem. Isto indica que o aumento na produção da toxina pelos mutantes, não está relacionada à esporulação. Contrariando alguns trabalhos em que afirma-se que a produção de toxinas é dependente da fase de esporulação, além de outros fatores (ZOUARI et al. 1998, 2002; ZOUARI e JAOUA 1999; BING-LAN e YEW -MIN 2000).

Os resultados do bioensaio indicam que os dois clones mutantes que produziram grande quantidade de esporos, foram aqueles que se destacaram na mortalidade de lagartas de *S. frugiperda* e mesmo os outros clones que produziram esporos em bastante quantidade, não foram eficientes no controle da lagarta. Isto indica que pode ter ocorrido uma mutação em um gene que não interfira na produção de esporos, mas em outro local importante quanto à síntese de proteína Cry. Estes genes podem estar inativos, sob o controle de um promotor ineficiente que pode ter sido mutado.

A importância desses dois clones é também devido ao fato de ter ocorrido um atraso no desenvolvimento das lagartas sobreviventes, enquanto a maioria das lagartas testadas com outros clones e até mesmo com a testemunha já havia se transformado

em pupa, estas ainda eram de pequenas a médio porte quando comparado com as lagartas existentes no controle (testemunha). Isso é um fator importante, pois não elimina por completo a existência desse inseto, mas o controla, podendo interferir na postura, como depositar um menor número de ovos, enfim, retardar o ciclo de vida do inseto.

Os clones apresentaram perfil protéico entre ~45 kDa e ~120 kDa, perfil característico entre estirpes ativas contra Lepidópteros. Algumas proteínas não foram detectadas em alguns clones, o que pode ser devido a alterações no promotor do gene *cry* correspondente à aquela proteína, não havendo a sua expressão (como no caso das proteínas de ~45 kDa e ~80 kDa). Além disso, a não expressão de um gene pode ser devida a regulação gênica por outro gene. Assim, nesse caso, além da regulação no próprio promotor, a não expressão pode ser devida a falta de expressão em um outro gene regulador, pertencente a mesma via de sinalização.

Todos os clones apresentaram uma banda de ~65 kDa, que pode ser referente a proteína Cry2Aa (SUN et al., 2008), mas a presença desta banda não indica que o gene esteja na sua forma nativa. Os outros clones que não tiveram níveis de mortalidades significativos, o gene *cry* correspondente desta proteína pode ter sofrido alterações em sua sequência devido a inserção do transposon. A inserção de mutações na sequência da parte ativa da toxina ou mesmo na parte responsável pela ligação aos receptores pode ter sido o fator que fez com que não tivessem ação nessa praga. Já nos clones que tiveram bons níveis de mortalidade (B9 e E2) apresentaram somente esta proteína de ~65 kDa similar ao isolado selvagem, que pode estar na sua forma nativa e ser a responsável pela sua ação inseticida. A ação inseticida pode ter sido incrementada pela presença de uma banda de ~120 kDa que não existia no isolado selvagem, que pode ser de um gene *cry1* que agora está sendo expresso ou pode ser um gene *cry* que teve o seu poder toxicológico alterado após a inserção do transposon.

6 CONCLUSÕES

Por fim, os resultados aqui obtidos demonstram a possibilidade de efetuar melhoramento genético de *B. thuringiensis*, com o intuito de:

- elevar a produção de proteínas Cry,
- viabilizar o uso comercial de isolados com baixa produtividade, por meio de mutagênese mediada por transposon
- abrir caminho para o estudo das vias metabólicas envolvidas nesta produção.

7 REFERÊNCIAS

ADAMS, L.F., VISICK, J. E., WHITELEY, H.R. A 20-kilodalton protein is required for efficient production of the *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* 27-kilodalton crystal protein in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 17, p. 521-330, 1989.

ARANTES, O. M. N. **Caracterização molecular do gene da delta-endotoxina, sua clonagem e transformação em *Bacillus thuringiensis* Berliner**. 1989. 124 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

BHATTACHARYA, P. R. Hyper-Production of Insecticidal Crystal Protein (d-Endotoxin) by *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* Is Not Related to Sporulation-Specific Biochemical Functions. **Curr. Microbiol.**, vol. 41, p. 187–191, 2000.

BECHTEL D. B.; BULLA, L. A. Electron microscope study of sporulation and parasporal crystal formation in *Bacillus thuringiensis*. **J. Bacteriol.**, v. 127 p. 1472-1481, 1976.

BING-LAN, L.; YEW-MIN, T. Characterization study of the sporulation kinetics of *Bacillus thuringiensis*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 68, p. 11–17, 2000.

BOURGOUIN, C.; DELÉCLUSE, A.; RIBIER, J.; KLIER, A.; RAPOPORT, G. A. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* gene encoding a 125-kilodalton larvicidal polypeptide is associated with inverted repeat sequences. **J. Bacteriology.**, v. 170, p. 3575-3583, 1988.

BRAVO, A., et al. Immunocytochemical Analysis of Specific Binding of *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Crystal Proteins to Lepidopteran and Coleopteran Midgut Membranes. **J. Invertebr. Pathol.**, v. 60, p. 247-254, 1992.

BRAVO, A., AGAISSE, H., SALAMITOU, S., LERECLUS, D. Analysis of *cry1Aa* expression in *sigE* e *sigK* mutants of *Bacillus thuringiensis*. **Mol. Gen. Genet.**, v. 250, p. 734-741, 1996.

BRAVO A., GILL S.S., SOBERÓN M. *Bacillus thuringiensis* mechanisms and use. In: Comprehensive molecular insect science. **Elsevier B.V.**; p. 175–206, 2005.

BROWN, K.L., WHITELEY, H.R. Isolation of a *Bacillus thuringiensis* RNA polymerase capable of transcribing crystal protein genes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 85, p. 4166-4170, 1998.

CRICKMORE, N. D., ELLAR, J. Improvement of a possible chaperonin in the efficient expresion of a cloned CryIIA δ -endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*. **Mol. Microbial.**, v. 6, p. 1537-1537, 1992.

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. **Microbiol. and Molec. Biol.**, v. 62, p.807-813, 1998.

CRICKMORE, N., et al. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature [online]. http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/index.html. Acesso em dezembro de 2008.

DE ESCUDERO, I. R. Nuevas cepas de la bacteria más utilizada como bioinsecticida en el control biológico de plagas agrícolas. <http://www.agroinformacion.com>. Universidad Pública de Navarra, 2006.

DE MAAGD, R.A.; BOSCH, D.; STIEKEMA, W. *Bacillus thuringiensis* toxin-mediated insect resistance in plants. **Trends in Plant Sciences**, London, v. 4, p. 9-13, 1999.

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

DERVIN, E., et al. Transcriptional regulation of the *cryIVD* gene operon from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **J. Bacteriol.**, v. 177, p. 2283-2291, 1995.

DIAS, J.M.C.S. Produção e utilização de bioinseticidas bacterianos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.27, p.59-76, 1992.

FEDHILA, S.; GUILLEMET, E.; NEL, P.; LERECLUS, D. Characterization of Two *Bacillus thuringiensis* Genes Identified by In Vivo Screening of Virulence Factors. **Appl and Environ Microbiol.**, v. 70, p. 4784–4791, 2004.

GE, B. X., et al. Differential effects of helper proteins encoded by the *cry2A* and *cry11A* operons on the formation of Cry2A inclusions in *Bacillus thuringiensis*. **FEMS Microbiol Lett.**, 165:35-41, 1998.

GHRIBI D, ZOUARI N, JAOUA S. Improvement of bioinsecticides production through mutagenesis of *Bacillus thuringiensis* by U.V. and nitrous acid affecting metabolic pathways and/or delta-endotoxin synthesis. **J. Appl. Microbiol.**, v. 97 p. 338–346, 2004.

GUILHABERT, M. R.; HOFFMAN, L. M.; MILLS, D. A.; KIRKPATRICK, B. C. Transposon mutagenesis of *Xylella fastidiosa* by electroporation of Tn5 synaptic complexes molecular. **Plant-Microbe Interaction**, v.14, p.701–706, 2001.

HABIB, M.E.M, ANDRADE, C.F.S. Bactérias Entomopatogênicas. In: **Controle Microbiano de insetos**. 2 ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. 1163p.

HAMER, L. et al. Recent advances in large-scale transposon mutagenesis. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 5, n. 1, p. 67-73, 2001.

HAWTHORNE, D. Predicting pest evolution predicting insect adaptation to a resistant crop. **J. Econon. Entomol.**, v.91, n.3, p.565-571, 1998.

JUDSON, N., MEKALANOS, J.J. Tnaraout, a transposon-based approach to identify and characterize essential bacterial genes. **Nature Biotechnology**, v. 18, p. 740-745, 2000.

KRYWUNCZYR, J., FAST, P.G. Sorological relationships of the crystal of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. **J. of Inverteb. Pathol.**, v. 36, p. 139-140, 1980.

LAEMMELI, U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of T4 bacteriophage. **Nature**, London, v. 227, p. 680-681, 1970.

LAIA, M. L., MOREIRA, L. M., DEZAJACOMO, J., et al. New genes of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* involved in pathogenesis and adaptation revealed by a transposon-based mutant library. **BMC Microbiology**, v. 9, p. 12, 2009.

LOGUERCIO, L.L. et. al. Milho BT. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 24, p. 46-52, 2002.

MACALUSO, A.; METTUS, A-M. Efficient Transformation of *Bacillus thuringiensis* Requires Nonmethylated Plasmid DNA. **J. of Bacteriol.**, v. 173, p. 1353-1356, 1990.

MAHLER, I.; HALVORSON, H.O. Two erythromycin-resistance plasmids of diverse origin and their effect on sporulation in *Bacillus subtilis*. **J. Gen. Microbiol.**, v. 120, p. 259–263, 1980.

MAIER, T. M., et al. In Vivo *Himar1*-Based Transposon Mutagenesis of *Francisella tularensis*. **Appl. and Environ. Microbiol.**, vol 72, p. 1878-1885, 2006.

MARMUR, J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. **Journal of Molecular Biology**, v. 3, 208–218, 1961.

MACLEAN, K., WHITELEY, H. R. Expression in *Escherichia coli* of a cloned crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **J. Bacteriol.**, v.169, p. 1017-1023, 1987.

MIRALLES, M. P.; PÉREZ, V.J. Aislamiento y establecimiento de una colección de *Bacillus thuringiensis*. In: BRAVO, A.; CERON, J. (Eds.) ***Bacillus thuringiensis* en el control biológico.**, p.207-232, 2004.

MONNERAT, R.G; BRAVO, A. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. In: **Controle Biológico**. Eds. Melo I.S. e Azevedo, J.L, Jaguariúna, SP, Embrapa Meio Ambiente, Vol. 3, p.163-200, 2000.

PAREKH, S., VINCI, V. A., STROBEL, R.J. Improvement of microbial strains and fermentation processes. **Appl Microbiol and Biotechnol.**, v. 54, p. 287-301, 2000.

PELICIC, V. et al. Mutagenesis of *Neisseria meningitides* by in vitro transposition of himar1 mariner. **J. Bacteriol.**, v. 182, n. 19, p. 5391-5398, 2000.

REICH, K. A.; CHOVAN, L.; HESSLER, P. Genome scanning in *Haemophilus influenzae* for identification of essential genes. **J. Bacteriol.**, v. 181, n. 16, p. 4961-4968, 1999.

SCHNEPF, E., et al., D.H., *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 62 (3), 775–806, 1998.

SOBERÓN, M.; BRAVO, A. *Bacillus thuringiensis* y sus toxinas insecticidas. 2001. On line. Disponível em: <http://biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/Cap12/>. Acesso em: 20 de julho 2008.

STANBURY, P. F., WHITAKER, A., HALL, S. J. Fermentation economics. In: **Principles of Fermentation Technology**, 2nd ed., Oxford: Pergamon Press, 1995. p. 331-341.

STEGGLES, J. R., WANG, J., ELLAR D. J. Discovery of *Bacillus thuringiensis* virulence genes using signature-tagged mutagenesis in an insect model of septicaemia. **Curr. Microbiol.**, vol. 53, p. 303–310, 2006.

SUN, Q.; WU, W.; QIAN, W.; HU, J.; FANG, R.; HE, C. High-quality mutant libraries of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and *X. campestris* pv. *campestris* generated by an efficient transposon mutagenesis system. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.226, p.145-150, 2003.

SUN, Y., FU, Z., DING, X., XIA, L. Evaluating the Insecticidal Genes and Their Expressed Products in *Bacillus thuringiensis* Strains by Combining PCR with Mass Spectrometry. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 74, p. 6811–6813, 2008.

TAILOR, R. J., TIPPET, et al. Identification and Characterization of a Novel *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Etomocidal to Coleopteran and Lepidopteran Larvae. **Mol. Microbiol.**, v. 6, n. 9, May, p. 1211-1217, 1992.

TABASHNIK, B. E., Evolution of Resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 39, p. 47-49. 1994.

TOUNSI S., et al. Improvement of *Bacillus thuringiensis* *d*- endotoxins synthesis yields through acquisition of erythromycin resistance. **Biotechnol. Lett.**, v. 28: 315–319, 2006.

TURGEON, N., et al. Elaboration of an electroporation protocol for *Bacillus cereus* ATCC 14579. **J. Microbiol. Meth.**, v. 67, p. 543-548, 2006.

VISICK, J.E., WHITELEY, H. R. Effects of a 20-kilodalton protein from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* on production of CytA protein by *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 173, p. 1748-1756, 1991.

WEISER, J. Impact of *Bacillus thuringiensis* on applied entomology in eastern Europe and in Soviet Union. In : Krieg A., Huger A. M., **Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt for Land und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem**, Berlin, 1986. p. 37-50.

WILSON, K. Preparation of Genomic DNA from Bacteria. In: AUSUBEL, F. M., et al (orgs). **Curr. Protoc. Mol. Biol.**, Brooklyn, N.Y. Green Publishing Associates, 1997. p.243-245.

WHITELEY H.R., SCHNEPF, H.E. The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. **Annu Rev Microbiol.**, v. 40, p. 549–576, 1986.

WONG, S. M.; MEKALANOS, J. J. Genetic footprinting with mariner-based transposition in *Pseudomonas aeruginosa*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 18, p. 10191-10196, 2000.

WU, D., FEDERICI, B. A. A 20-kilodalton protein preserves cell viability and promotes CytA cristal formation during sporulation in *Bacillus thuringiensis*. **J. Bacteriol.**, v. 175, p. 5276-5280, 1993.

WU, D., FEDERICI, B. A. Improved production of the insecticidal CryIVD protein in *Bacillus thuringiensis* using cry1Ac promoters to express the gene for an associated 20kDa protein. **Appl. Microbiol. Biotchnol.**, v. 42, p. 697-702, 1995.

YOSHISUE, H., et al. Effects of *Bacillus thuringiensis* 20kDa protein on production of the *Bti* 130kDa crystal protein in *Escherichia coli*. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 56, p. 1429-1433, 1992.

ZHONG, C. H., ELLAR D. J., et al. Characterization of *Bacillus truringiensis* delta-endotoxin which is toxic to insects in three orders. **J. Inverteb. Pathol.**, v. 76, n. 2, Aug, p.131-139. 2000.

ZOUARI, N.; DHOUIB, A.; ELLOUZ, R.; JAOUA, S. Nutritional requirements of a strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaki and use of gruel hydrolysate, for the formulation of a new medium for delta-endotoxin production. **Appl Biochem Biotechnol.**, v. 69, p. 41–52, 1998.

ZOUARI, N.; JAOUA, S. The effect of complex carbon and nitrogen, salt, Tween-80 and acetate on delta-endotoxin production by a *Bacillus thuringiensis* subsp kurstaki. **J. Indust Microbiol. Biotechnol.**, v. 23, p. 497–502, 1999.

ZOUARI, N.; BEN SIK ALI, S.; JAOUA, S. Production of deltaendotoxins by several *Bacillus thuringiensis* strains exhibiting various entomocidal activities towards Lepidoptera and Diptera in gruel and fish-meal media. **Enzyme and Microbial Technology** 31, 411–418, 2002.