

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

***Bacillus thuringiensis*: DIVERSIDADE GÊNICA, ESTRUTURA
GENÉTICA DE POPULAÇÕES E EFICIÊNCIA NO CONTROLE
DE *Plutella xylostella* (L., 1758) (Lepidoptera: Plutellidae)**

Ana Maria Guidelli Thuler

Bióloga

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Setembro de 2007

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

***Bacillus thuringiensis*: DIVERSIDADE GÊNICA, ESTRUTURA
GENÉTICA DE POPULAÇÕES E EFICIÊNCIA NO CONTROLE
DE *Plutella xylostella* (L., 1758) (Lepidoptera: Plutellidae)**

Ana Maria Guidelli Thuler

Orientador: Prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Microbiologia (Microbiologia Agropecuária).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Setembro de 2007

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

ANA MARIA GUIDELLI THULER – nascida em Jaboticabal - SP, em 23 de setembro de 1978. Ingressou no curso de Biologia pelo Centro Universitário Barão de Mauá – Ribeirão Preto – SP no ano de 1997. Foi bolsista de Treinamento Técnico nível 1 (FAPESP) e de Iniciação Científica durante a graduação, recebendo o título de Bióloga em Janeiro de 2001. Neste mesmo ano ingressou no curso de mestrado em Microbiologia, pela Universidade Estadual Paulista - UNESP/Jaboticabal – SP, onde obteve o título Mestre em Microbiologia Agropecuária, em julho de 2003. Iniciou o Curso de doutorado pela mesma universidade em agosto de 2003.

“... E ainda se vierem noites traiçoeiras
Se a cruz pesada for; Cristo estará contigo.
O mundo pode até fazer você chorar,
Mas DEUS te quer sorrindo...”

(Carlos Papae)

Ao meu amor, meu marido
Robson Thomaz Thuler,
VERDADEIRA PROVIDÊNCIA DIVINA EM MINHA VIDA,
por caminhar ao meu lado, me apoiando em cada momento;
trazendo-me sempre a paz e a segurança do seu abraço.

Aos meus amados pais
Sebastião Guidelli e Laura Lisbôa Guidelli,
exemplos de vida, pelo apoio e amor incondicional, e por terem me
proporcionado tantas oportunidades para que eu trilhasse meu caminho até
aqui. Vocês são a base para todas as conquistas que fiz e farei em minha vida.

DEDICO

Às minhas irmãs Silvia e Eliana e às famílias formadas por elas, pelo apoio, carinho, atenção e incentivo absoluto.

Ao meu irmão Eder

pelo carinho, “pregos no sapato” e companheirismo.

Ao Gú, Loise e Ana Catarina, por me trazerem tanta alegria!

À minha nova família, especialmente meus sogros

Sr. Melquiades José Thuler e D. Juracy Thomaz Thuler,

pelo total acolhimento, carinho e orações constantes.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A nosso maravilhoso Deus, que em sua bondade infinita ilumina o caminho que percorremos e nos dá a oportunidade de aprender coisas tão belas, na ciência e no amor.

À comunidade “UNESPIANA” pela oportunidade concedida e pela disponibilidade estrutural e funcional.

Ao meu amigo e orientador desde a Iniciação Científica: Prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos, que com sua atenção, apoio e incentivo, tornaram possível a existência deste trabalho – “a realização de um sonho”. Obrigada pelos ensinamentos profissionais e pelo exemplo de vida nesta longa caminhada!

À Prof^a. Dr^a. Janete Aparecida Desidério Sena, pela disponibilidade, amizade, profissionalismo, além das sugestões sempre valiosas.

À Prof^a. Dr^a. Gislayne L. T. Vilas-Bôas (UEL) pela amizade e valiosas sugestões na elaboração do projeto de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Antonio Sérgio Ferraud, pela disponibilidade e ajuda na análise estatística.

À Dr^a. Simone Cristina Picchi, pela ajuda na realização das análises de Estrutura Populacional, pelas sugestões e amizade, sempre disposta para o que for preciso.

Ao Prof. Dr. Sergio Antonio De Bortoli, por ceder a estrutura do seu laboratório para os bioensaios, pela disponibilidade, convivência e idéias sempre pertinentes.

Aos Professores do Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária, em especial à Prof^a. Dr^a. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos, pela colaboração, incentivo e preciosos ensinamentos.

À Eliane Cristina da Cunha Alves, pela amizade e imprescindíveis auxílios e sugestões na condução dos experimentos.

Ao meu querido amigo Irlan Leite de Abreu pela convivência, parceria e companheirismo no laboratório e em todos os momentos. *“Nós vamos conseguir!”*

Às queridas amigas: Camila Chiaradia Davolos, Juliana Regina Rossi e Sandra de Oliveira Conde, pela amizade sempre sincera, valiosas ajudas experimentais, incansáveis eletroforeses, total disponibilidade e companhia imprescindível no laboratório e para um bom cafezinho!

Aos integrantes do Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA), recentes ou antigos, porém eternos na lembrança: Daniel, Daniela Jatinha, Elaine, Emeline, Fernanda, Flávia, Janaína, Jefferson, Larissa, Juliana Costa, Juliana Xavier, Martinha, Michele, NAJARA, Natália Leitão, Paula, Suzana Marucci, Suzana, Vivian e Viviane. Obrigada pela agradável convivência e toda ajuda que tive de vocês!

Ao casal de amigos Cácia e Francisco (Dé), pelo convívio e amizade construída durante esses últimos anos. *“No fim, sempre dá certo!”*

Aos colegas mais recentes do Laboratório, aqui não citados, porém, sempre lembrados, meus agradecimentos de coração.

Aos professores e funcionários da FCAV-UNESP, em especial aos do Departamento de Biologia Agropecuária, nas pessoas da funcionária Lucina e do funcionário Aldo pela amizade, agradável convívio e pela alegria nos serviços prestados.

Às funcionárias da Seção de Pós-Graduação da FCAV/Unesp-Jaboticabal pelas orientações e paciência.

À Fundação CAPES/MEC (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/ Ministério da Educação), pela concessão da bolsa de estudos.

Aos funcionários da Biblioteca, pela ajuda no decorrer de todo o curso.

Enfim, a todos os amigos do programa de Microbiologia Agropecuária e da FCAV-UNESP, que de alguma forma, direta ou indiretamente, contribuíram para minha formação científica e pessoal, meus sinceros agradecimentos!

SUMÁRIO	PÁG.
CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
CAPÍTULO 2 - <i>Bacillus thuringiensis</i> : DIVERSIDADE GÊNICA EM ISOLADOS LEPIDOPTERA-ESPECÍFICOS	10
INTRODUÇÃO	10
MATERIAL E MÉTODOS	12
RESULTADOS	16
DISCUSSÃO	22
CONCLUSÕES	25
REFERÊNCIAS.....	26
CAPÍTULO 3 – ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE <i>Bacillus thuringiensis</i> DE DIFERENTES COLEÇÕES E REGIÕES BRASILEIRAS.....	31
INTRODUÇÃO	31
MATERIAL E MÉTODOS	34
RESULTADOS	38
DISCUSSÃO	61
CONCLUSÕES	68
REFERÊNCIAS.....	69
CAPÍTULO 4 – CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS BRASILEIROS DE <i>Bacillus thuringiensis</i> E EFICIÊNCIA DE CONTROLE PARA <i>Plutella xylostella</i> (L., 1758) (Lepidoptera: Plutellidae)	74
INTRODUÇÃO	74
MATERIAL E MÉTODOS	77
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	82
REFERÊNCIAS.....	86
CONSIDERAÇÕES FINAIS	90
ANEXO.....	92

***Bacillus thuringiensis*: DIVERSIDADE GÊNICA, ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES E EFICIÊNCIA NO CONTROLE DE *Plutella xylostella* (L., 1758) (Lepidoptera: Plutellidae)**

RESUMO - O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA) da FCAV-UNESP. Foram caracterizados geneticamente, por PCR, isolados de *Bacillus thuringiensis*, provenientes de três coleções brasileiras, quanto aos tipos de genes *cry1*, avaliando-se o efeito dos mesmos sobre uma população de *Plutella xylostella* caracterizando-se também os isolados de *B. thuringiensis* quanto à presença de enterotoxinas HBL, NHE e o regulador pleitrópico PLC, por verificação biomolecular, avaliando a variabilidade, bem como a estruturação genética de populações de *B. thuringiensis*, por PCR-RFLP. Verificou-se que existe uma distribuição homogênea das subclasses *cry1* dentro do banco de isolados de *B. thuringiensis*, com maior porcentagem de isolados portadores dos genes *cry1Ab* (42,12%) e com menor porcentagem de representantes da subclasse *cry1Db* (0,6%). Nos bioensaios observou-se 100% de mortalidade para lagartas de *P. xylostella* com os isolados utilizados, indicando que combinações de tipos diferentes de genes *cry1* apresentam ação tóxica para larvas de *P. xylostella*. Analisando a estrutura populacional de *B. thuringiensis* foram obtidos 78 haplótipos, definidos para as populações das diferentes coleções, e 76 haplótipos, definidos para as populações de diferentes regiões brasileiras, retratando a variabilidade genética para os loci *hblA*, *plcR*, *nheBC* e *cry1* analisados. Segundo valores FSTs, de comparação duas a duas, diferenças significativas entre coleções e populações de *B. thuringiensis* provenientes das regiões brasileiras foram verificadas. Mesmo assim, alguns grupos formados são constituídos por uma população clonal de isolados da bactéria.

Palavras-Chave: variabilidade genética, *cry1*, controle biológico, enterotoxinas, estrutura populacional, controle microbiano, entomopatógenos

***Bacillus thuringiensis*: GENE DIVERSITY, POPULATIONS' GENETIC STRUCTURE
AND CONTROL EFFICIENCY TO *Plutella xylostella* (L.,1758) (Lepidoptera:
Plutellidae)**

SUMMARY - The work was developed in the Laboratory of Bacterias' Genetics and Applied Biotechnology (LGBBA) at UNESP/ Jaboticabal Campus. There were genetically characterized, by PCR, isolates of *B. thuringiensis*, belonging to three Brazilian collections based on *cry1* gene content, evaluating their effects on *Plutella xylostella*. They were also characterized concerning their enterotoxins production such as HBL, NHE and the PLC virulence factor, using molecular techniques, so as to evaluate their gene diversities, as well as their population genetic, using the PCR-RFLP approach. It was observed a homogeneous distribution of the *cry1* subclasses within *B. thuringiensis* strain collections studied, with bigger percentage of isolates showing the *cry1Ab* genes (42.12%) and with lower percentage of isolates for subclass *cry1Db* (0.6%). The bioassays have revealed 100% mortality to *P. xylostella* larvae meaning that the effectiveness of *B. thuringiensis* as a biological control agent does not depend at the *cry* genes content. When the *B. thuringiensis* population structure was considered, 78 haplotypes were defined for the strains contents of different collections and 76 haplotypes were defined for strains of different Brazilian regions, exhibiting the great genetic variability for *hblA*, *plcR*, *nheBC* and *cry1* loci. According to the FSTs values for establish pair comparisons, significant differences among the *B. thuringiensis* collections and populations, were observed. Nevertheless some of the formed groups were considered as bacterial clonal population.

Keywords: genetic variability, *cry1*, biological control, enterotoxins, population structure, microbial control, entomopathogen

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

A bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* é amplamente utilizada como alternativa no controle biológico de diversas pragas agrícolas. Produtos à base desta bactéria têm sido utilizados há mais de 50 anos e proporcionam inúmeras vantagens, tais como especificidade ao inseto-alvo, efeito não poluente ao ambiente, inocuidade a mamíferos e vertebrados e por não serem fitopatogênicas (MONNERAT & BRAVO, 2000; CÁRDENAS et al., 2001).

Os trabalhos para o desenvolvimento de novos bioinseticidas à base de *B. thuringiensis* são muito importantes, pois as diferentes formulações e a descoberta de estirpes com diferentes toxinas podem promover maior atividade tóxica e um melhor resultado do produto em diferentes condições ambientais (MEDEIROS et al., 2006).

O crescente uso da proteína cristal e a não toxicidade causada a mamíferos tem intensificado pesquisas de novas linhagens com diferentes espectros de atividade. Em adição, o interesse de se encontrar novas linhagens tem sido grande devido a um aumento no manejo preventivo de resistência de insetos a *B. thuringiensis* pelo uso de proteínas inseticidas (CAROZZI et al., 1991).

A patogenicidade e a especificidade de uma linhagem são determinadas pelos tipos de genes *cry* funcionais que o *B. thuringiensis* possui. Estes genes codificam para as proteínas Cry, que são sintetizadas na forma de protoxinas. A toxicidade das mesmas está associada ao componente N-terminal, enquanto o componente C-terminal determina a formação da estrutura do cristal (LI et al., 1991). Ao serem ingeridas por um inseto suscetível, as protoxinas são solubilizadas no ambiente alcalino do intestino do inseto, e convertidas em δ -endotoxinas. As toxinas hidrolisadas cruzam a membrana peritrófica, ligam-se a receptores específicos nas células colunares do intestino médio, formando poros que aumentam a permeabilidade da membrana, interferindo no gradiente iônico e balanço osmótico da membrana apical. O aumento na absorção de água causa lise celular e eventual ruptura e desintegração das células do intestino

médio. O inseto também pode morrer por inanição, uma vez que, pouco tempo após a infecção ele pára de se alimentar (HOFTE & WHITELEY, 1989; KNOWLES, 1994; COPPING & MENN, 2000).

Vários genes que codificam para a proteína cristal fazem parte de uma estrutura complexa, a qual inclui vários elementos genéticos móveis, como transposons e IS (*Insertion Sequences*). Acredita-se que esta característica, associada ao processo de conjugação, seja responsável pela multiplicidade dos genes *cry* (KRONSTAD & WHITELEY, 1984; LERECLUS et al., 1984)

Dentre as diversas linhagens de *B. thuringiensis*, algumas apresentam um único gene codificador da δ -endotoxinas, como a linhagem *kurstaki* HD73, que contém somente o gene *cry1Ac* localizado em um único plasmídio de 50 MDa (LERECLUS et al., 1993). No entanto, as linhagens podem apresentar genes *cry* diferentes. Este é o caso da linhagem *aizawai* 7.29, que contém cinco genes, estando quatro deles localizados no cromossomo ou megaplasmídio, e um quinto em um plasmídio de 45 MDa (SANCHIS et al., 1988). Por outro lado, na variedade *israelensis*, foram encontrados cinco genes, sendo quatro codificadores de δ -endotoxina e um gene que codifica uma citolisina, todos localizados em um único plasmídio de 72 MDa (BOURGOUIN et al., 1988).

Estudos que verificam a abundância, a distribuição e a diversidade de isolados de *B. thuringiensis* são importantes não somente para a busca de novas alternativas de controle de insetos, mas também para responder questões ligadas à evolução (e conseqüentemente à classificação) e às relações ecológicas da espécie. Desta forma, a variabilidade genética entre diferentes isolados de *B. thuringiensis* vem sendo estudada, principalmente através da utilização de técnicas que tem como base a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), como a técnica de RFLP (Polimorfismo do Comprimento do Fragmento de Restrição), onde o produto de amplificação é clivado e o padrão de bandas obtidas em géis determina o tipo de genes *cry* presentes na linhagem ou identifica a ocorrência de novos tipos de genes (KUO & CHAK, 1996).

As diversas linhagens de *B. thuringiensis* produzem, em adição às δ -endotoxinas, uma série de outras toxinas que podem ou não participar da ação entomopatogênica.

Destas, a principal é a proteína Cyt, de peso molecular 28kDa. Esta toxina é uma citolisina de ação inespecífica, produzida principalmente pela variedade *israelensis*, sendo acumulada no cristal juntamente com as δ -endotoxinas típicas desta variedade. Por não apresentar homologia com as demais proteínas Cry, as toxinas Cyt não são classificadas como δ -endotoxinas (LERECLUS et al., 1993).

Uma multiplicidade de fatores de virulência extracelular é produzida no final da fase vegetativa, com o objetivo de promover a rápida adaptação da bactéria ao ambiente. Estes fatores, produzidos por *B. thuringiensis* e *Bacillus cereus*, incluem enzimas degradativas, proteínas de superfície e substâncias citotóxicas. A proteína Vip, por exemplo, foi descrita primeiro em *B. cereus* e possui forte atividade inseticida. Ela é também produzida por muitas linhagens de *B. thuringiensis*, não fazendo parte do cristal protéico, possuindo 80-100 kDa e apresentando espectro de hospedeiros restritos aos insetos sensíveis às proteínas Cry. Apesar de não possuírem estruturas semelhantes, determinam formas de intoxicação similar: paralisia intestinal e lise das células do epitélio do intestino (LERECLUS et al., 2000).

O papel dos fatores de virulência é objeto de intensos estudos que têm permitido a formulação de hipóteses como a de LERECLUS et al. (2000), sugerindo que durante a fase de esporulação, a regulação dos genes *cry* objetiva a produção massiva de proteínas Cry suficiente para matar a larva de um inseto alvo. Isto permitiria a germinação dos esporos e a multiplicação das células bacterianas em seu intestino. A produção de fatores extracelulares, em resposta a exaustão de nutrientes, capacita a bactéria a danificar e invadir tecidos do hospedeiro, ganhando acesso a fontes alternativas de nutrientes, dando condições favoráveis para um novo ciclo de multiplicação ou crescimento exponencial.

Além da ação entomopatogênica, *B. thuringiensis* foi descrito em casos de doenças gastrointestinais (JACKSON et al., 1995; NOGUCHI, 1993) e, em algumas linhagens desta bactéria foi detectada a presença de genes sabidamente envolvidos na patogênese de *B. cereus* (FREDERIKSEN et al., 2006; HANSEN & HENDRIKSEN, 2001; HSIEH et al., 1999; PRÜSS et al., 1999; MÄNTYNEN & LINDSTRÖM, 1998), bactéria que causa sérios problemas à indústria de produtos alimentícios,

especialmente à de produtos lácteos. A presença desta bactéria pode causar alterações na textura e/ou, no odor do alimento pela multiplicação de células vegetativas ou pela produção de toxinas. O resultado final deste processo é a contaminação alimentar, que pode provocar vômitos ou diarreias no organismo humano. Estes sintomas podem ser iniciados poucas horas após a ingestão do alimento, dependendo do tipo de toxina ingerida, se eméticas (produzidas pela multiplicação das células no alimento) ou diarreicas (produzidas durante a multiplicação das células de *B. cereus* no intestino delgado) (GRANUM & LUND, 1997).

As linhagens de *B. cereus* secretam uma bateria de enzimas extracelulares e toxinas que são, supostamente, importantes fatores para a sua patogenicidade. O *B. cereus* pode expressar pelo menos duas enterotoxinas distintas de múltiplos-componentes. A enterotoxina hemolítica denominada HBL é o produto de um operon, que inclui os genes *hblA*, *hblD*, e *hblC*, que codificam o componente de ligação (B) e os componentes líticos, L1 e L2, respectivamente (HSIEH et al., 1999). Adicionalmente, um operon da enterotoxina não-hemolítica, NHE, de *B. cereus*, também foi caracterizado e é composto por três diferentes proteínas NheA, NheB e NheC, codificadas pelos genes *nheA*, *nheB* e *nheC* (GRANUM et al., 1999).

As enterotoxinas HBL e NHE são atualmente apontadas como causadoras das infecções diarreicas por contaminação alimentar devido a *B. cereus*. As atividades hemolíticas, citotóxicas e dermonecroticas, a permeabilidade vascular e o acúmulo de fluídos nas alças do íleo de coelhos são sintomas associados com enterotoxinas detectadas em culturas filtradas de linhagens toxigênicas de *B. cereus* (AGATA et al., 1995; KOTIRANTA et al., 2000; LUND & GRANUM, 1996).

Outros fatores de virulência são produzidos por linhagens de *B. cereus* e incluem três tipos de fosfolipases C, cada uma com um mecanismo de ação diferente, o que se supõe contribuir para lesar o tecido por induzir a degradação dos neutrófilos (DING et al., 1995; WAZNY et al., 1990). Os genes das fosfolipases C são regulados pelo regulador pleiotrópico PlcR. Estes genes *plcR*-regulados estão envolvidos no controle da expressão de fatores extracelulares de virulência e na patogenicidade, incluindo as enterotoxinas, em *Bacillus* spp. Embora, provavelmente, o gene *plcR* esteja presente

em todos os membros do grupo de *B. cereus*, e o polipeptídeo codificado por *plcR* de *B. cereus* é funcionalmente equivalente ao de *B. thuringiensis*, o polipeptídeo codificado pelo *plcR* de *B. anthracis*, por exemplo, é truncado e não funciona como um ativador de transcrição (AGAISSE et al., 1999). Portanto, estes fatos implicam na taxonomia entre membros do grupo de *B. cereus*, nas propriedades de virulência destas bactérias e na segurança do uso de bioinseticidas à base de *B. thuringiensis*.

Dada à similaridade taxonômica de linhagens de *B. cereus* e de *B. thuringiensis* e à introdução de um grande número de esporos de *B. thuringiensis* em produtos alimentícios, através das culturas agrícolas tratadas com inseticidas a base desta bactéria (FREDERIKSEN et al., 2006) este trabalho teve como objetivo caracterizar isolados de *B. thuringiensis* quanto a presença de subclasses de genes *cry1*; verificar a efetividade de alguns isolados no controle de *Plutella xylostella* (L., 1758) (Lepidoptera: Plutellidae), por meio de bioensaio, bem como traçar um paralelo entre os isolados e a presença de enterotoxinas HBL, NHE e o regulador pleitrópico PlcR, por verificação biomolecular, traçando um perfil da variabilidade genética existente nas populações de *B. thuringiensis* analisadas.

REFERÊNCIAS

AGATA, N.; OHTA, M.; ARAKAWA, Y.; MORI, M. The *bceT* gene of *Bacillus cereus* 21 encodes an enterotoxic protein. **Microbiology**, New York, v.141, n.4, p.983-988, 1995.

AGAISSE, H.; GOMINET, M.; ANDREAS, E. O. A.; KOLSTÛ, A.; LERECLUS, D. PlcR is a pleiotropic regulator of extracellular virulence factor gene expression in *Bacillus thuringiensis*. **Molecular Microbiology**, Oxford, v.32, n.5, p.1043-1053, 1999.

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. **Journal Bacteriology**, Washington, v.170, n.8, p.3575-3583, 1988.

CÁRDENAS, M.I.; GALÁN-WONG, L.; FERRÉ-MANZANERO, J.; PEREYRA-ALFÉREZ, B. Selección de toxinas *cry* contra *Trichoplusia ni*. **Ciencia Uanl**, Monterrey, v.4, n.1, p.51-62, 2001.

CAROZZI, N.B.; KRAMER, V.C.; WARREN, G.W.; EVOLA, S.; KOZIEL, M.G. Prediction of insectidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.57, n.11, p.3057-3061, 1991.

COPPING, L. G.; MENN, J.J. Review biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. **Pest management science**, Sussex, v.56, n.88, p.651-676, 2000.

DING, Y.; UITTO, V.J.; FIRTH, J.; SALO, T.; HAAPASALO, M.; KONTTINEN, Y.T.; SORSA, T. Modulation of host matrix metalloproteinases by bacterial virulence factors relevant in human periodontal diseases. **Oral Diseases**, Hampshire, v.1, n.04, p.279-286, 1995.

FREDERIKSEN, K.; ROSENQUIST, H.; JORGENSEN K.; WILCKES, A. Occurrence of natural *Bacillus thuringiensis* contaminants and residues of *Bacillus thuringiensis*-based insecticides on fresh fruits and vegetables. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.72, n.5, p.3435–3440, 2006.

GRANUM, P. E., O'SULLIVAN, K.; LUND, T. The sequence of the non-haemolytic enterotoxin operon from *Bacillus cereus*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.177, n.2, p.225–229, 1999.

GRANUM, P.E; LUND, T. *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.157, n.2, p. 223-228, 1997.

HANSEN, B. M.; HENDRIKSEN, N. B.. Detection of enterotoxigenic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.67, n.1, p.185-189, 2001.

HOFTE, H.; WHITELEY, H.R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiological Reviews**, Washington, v.53, n.2, p.242-255, 1989.

HSIEH, Y. M.; SHEU S. J.; CHEN, Y. L.; TSEN, H. Y. Enterotoxigenic profiles and polymerase chain reaction detection of *Bacillus cereus* group cells and *B. cereus* strains from foods and food-borne outbreaks. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.87, n.4, p.481-490, 1999.

JACKSON, S. G.; GOODBRAND, R. B.; AHMED, R.; KASATIYA, S. *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolated in a gastroenteritis outbreak investigation. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.21, n.2, p.103-105, 1995.

KNOWLES, B. H. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal δ -endotoxins. **Advances in Insect Physiology**, London, v.24, p.275-308, 1994.

KOTIRANTA, A.; LOUNATMAA, K.; HAAPASALO, M. Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. **Microbes and Infection**, Paris, v.2, n.22, p.189-198, 2000.

KRONSTAD, W.; WHITELEY, H. R. Inverted repeat sequences flank a *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene. **Journal Bacteriology**, Washington, v.160, n.1, p.95-102, 1984.

KUO, W. S.; CHAK, K. F. Identification of novel cry-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains on the basis of restriction fragment length polymorphism of the PCR-amplified DNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.62, n.4, p.1369-1377, 1996.

LERECLUS D.; RIBIER, J.; KLIER, A.; MENU, G.; LECADET, M. M. A transposon-like structure related to the delta-endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis*. **EMBO Journal**, Oxford, v.3, n.11, p.2561-2567, 1984.

LERECLUS, D.; AGAISSE, H.; GRANDVALET, C.; SALAMITOU, S.; GOMINET, M. Regulation of toxin and virulence gene transcription in *Bacillus thuringiensis*. **International Journal of Medical Microbiology**, Amsterdam, v.290, n.4-5, 295-299, 2000.

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

LI, J. D.; CARROLL, J.; ELLAR, D. J. Crystal structure of insecticidal delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. **Nature**, New York, v.353, n.6347, p.815-821, 1991.

LUND, T.; GRANUM, P. E. Characterization of a non-haemolytic enterotoxin complex from *Bacillus cereus* isolated after a foodborne outbreak. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.141, n.02, p.151-156, 1996.

MÄNTYNEN, V.; LINDSTRÖM, K. A rapid PCR-based DNA test for enterotoxic *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.64, n.5, p.1634-1639, 1998.

MEDEIROS, P. T; SONE, E. H; SOARES, C. M. S; DIAS, J. M. C. S; MONNERAT, R. G. Evaluation of insecticides based on *Bacillus thuringiensis* in the control of the diamondback moth. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.24, n.2, p. 245-248, 2006.

MONNERAT, R.S.; BRAVO, A. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed). **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. v.3, p.163-200.

NOGUCHI, H. Development of *Bacillus thuringiensis* in Japan. In: Kim, L. (Ed.), **Advanced engineered pesticides**. New York: Marcel Dekker, 1993.p. 283–291.

PRUSS, B. M.; DIETRICH, R.; NIBLER, B.; MARTLBAUER, E.; SCHERER, S. The hemolytic enterotoxin HBL is broadly distributed among species of the *Bacillus cereus* group. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.65, n.12, p.5436-5442, 1999.

SANCHIS, V.; LERECLUS, D.; MENOUE, G.; CHAUFAX, J.; LECADET, M. M. Multiplicity of delta-endotoxin genes with different insecticidal specificities in *Bacillus thuringiensis* aizawai 7.29. **Molecular Microbiology**, Oxford, v.2, n.3, p.311-331, 1988.

WAZNY, T.K.; MUMMAW, N.; STYRT, B. Degranulation of human neutrophils after exposure to bacterial phospholipase C. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, Wiesbaden, v.9, n.11, p.830-832, 1990.

CAPÍTULO 2 - *Bacillus thuringiensis*: DIVERSIDADE GÊNICA EM ISOLADOS LEPIDOPTERA-ESPECÍFICOS

INTRODUÇÃO

O controle de insetos-praga é um aspecto fundamental na produção agrícola, tanto para grandes como para pequenos produtores (MONNERAT & BRAVO, 1999). Nos últimos anos, tem sido alto o investimento na otimização de agentes de controle biológico, mas apesar disso, somente alguns bioinseticidas têm sido empregados. Estatísticas mostram que apenas 1% das pragas agrícolas e vetores de doenças são controlados por compostos originários de organismos vivos. Entretanto, a bactéria *Bacillus thuringiensis* é responsável por 90-95% do mercado de bioinseticidas (VALADARES-INGLIS et al., 1998).

VILAS-BÔAS & LEMOS (2004) apresentaram a caracterização do conteúdo de genes *cry* como a principal motivação para a realização de amplos programas de busca de novas linhagens. Cerca de 300 genes *cry* foram seqüenciados e classificados em 50 grupos e diferentes subgrupos. Mesmo considerando-se a variabilidade das proteínas Cry até agora descritas, é ainda extremamente necessária a busca por novas toxinas, visando o controle de um número maior de insetos. É também importante encontrar alternativas para o controle da resistência de insetos às toxinas Cry, especialmente com o advento das plantas transgênicas.

A busca e a caracterização de novos genes *cry* podem resultar em novas alternativas para o controle de espécies de insetos com nenhuma ou pouca suscetibilidade às proteínas Cry atualmente conhecidas, além de auxiliar no desenvolvimento de sistemas de manejo que evitem ou minimizem o aparecimento de resistência a *B. thuringiensis* em populações de insetos alvo em campo. Atualmente, os casos mais graves de resistência ocorreram com a lagarta *Plutella xylostella* (L., 1758) (Lepidoptera: Plutellidae) (TABASHINIK et al., 1990; FERRÉ et al., 1991 e TABASHINIK, 1994).

A caracterização de linhagens mantidas em coleções de *B. thuringiensis* pode auxiliar no entendimento do papel destas bactérias no ambiente e na distribuição de genes *cry*. O trabalho de FEITELSON et al. (1992) propôs que espécies de insetos e linhagens de *B. thuringiensis* vêm coevoluindo. Seguindo a mesma corrente de pensamento, BRAVO et al. (1998) demonstraram que alguns genes *cry* foram distribuídos diferentemente em algumas regiões geográficas analisadas.

A variabilidade genética entre diferentes isolados de *B. thuringiensis* foi estudada principalmente através da utilização de técnicas que têm como base a PCR. Estas técnicas apresentam aplicações tais como a determinação da persistência da bactéria no ambiente (BOURQUE et al., 1993) e a predição da atividade tóxica de uma linhagem através da determinação do conteúdo de genes *cry*, muitas vezes evidenciando a presença de genes desconhecidos e direcionando os trabalhos de bioensaio (SAUKA et al., 2006; IBARRA et al., 2003; BRAVO et al., 1998; CERÓN et al., 1994; 1995).

Na busca por novos genes *cry*, várias coleções de linhagens de *B. thuringiensis* foram avaliadas (BERÓN & SALERNO, 2006; JARA et al., 2006; KIM, 2000; ZHANG et al., 2000; BRAVO et al., 1998; BEN-DOV et al., 1997), mas poucos são os trabalhos que contemplaram amostras brasileiras (IBARRA et al., 2003; VILAS-BÔAS & LEMOS, 2004). Levando-se em consideração o fato de que o Brasil é um país que apresenta regiões com clima tropical e subtropical, contendo uma rica diversidade biológica, pode-se presumir que estas condições tenham propiciado o estabelecimento de uma alta diversidade de isolados em solos brasileiros. Dentro deste contexto, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar geneticamente 1073 isolados de *B. thuringiensis*, com ênfase principal na análise do conteúdo de genes *cry1* apresentados por estes.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Linhagens bacterianas

Foram analisados 1073 isolados de *B. thuringiensis* obtidos de vários locais do território brasileiro, gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Sérgio Batista Alves do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos (Depto. de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da ESALQ/USP) Piracicaba/SP, pelo Dr. Edílson Paiva (Núcleo de Biologia Aplicada da EMBRAPA Milho e Sorgo) Sete Lagoas/MG e pelo Prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos (Depto. de Biologia Aplicada a Agropecuária da FCAV/UNESP), Jaboticabal. Todos os isolados encontram-se mantidos em culturas estoques no Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA) da FCAV/UNESP, Jaboticabal.

Dos 1073 isolados de *B. thuringiensis* submetidos à análise 11,4% (123) eram da coleção de Jaboticabal, 28,9% (310) de Piracicaba e 59,7% (640) de Sete Lagoas, sendo as amostras coletadas de solo urbano, solos não cultivados e cultivados com cereais, hortícolas e frutíferas, silagem, insetos mortos, poeira acumulada em produtos estocados (cereais como milho, sorgo etc.), entre outros em diferentes estados do Brasil.

Os isolados das coleções foram previamente caracterizados em seus locais de origem como sendo *B. thuringiensis*, após minuciosa observação microscópica para a constatação da presença de inclusões cristalinas. Mesmo assim, uma amostragem realizada nas coleções da ESALQ e da EMBRAPA foi submetida novamente à análise microscópica antes que as mesmas integrassem o novo banco. Na nova análise foi confirmada a presença de cristais protéicos, sendo portanto, todas as 1073 amostras devidamente etiquetadas e estocadas no LGBBA (UNESP-Jaboticabal).

Com a confirmação específica dos isolados de *B. thuringiensis* procedeu-se à extração de DNA total em quantidade e qualidade adequadas para as reações de amplificação.

2. Extração de DNA pelo Kit InstaGene Matrix (Bio-Rad)

Os isolados de *B. thuringiensis* foram previamente cultivados em placas contendo meio NA sólido, por 12 h a 30°C. Para cada isolado uma colônia foi ressuspendida em 1 ml de água estéril em tubos de microcentrífuga e levados à centrifugação por 1 min. a 15.000 x g a 20°C.

Após centrifugação o sobrenadante foi descartado, sendo adicionados 200 µl da Matriz InstaGene Matrix (Bio-Rad) e, em seguida, o material foi incubado em banho-maria a 56°C por 20 min, agitado rigorosamente em vórtex por 10 s e incubado em água fervente (100°C) por 8 min. A amostra foi novamente agitada em “vórtex” por 10 s e centrifugada a 20°C por 3 min. Finalmente, 200 µl do sobrenadante foram colhidos, transferidos para um poço de uma microplaca de polipropileno contendo 96 poços (DNA de um isolado/poço), a qual foi estocada em freezer - 20°C até o momento do uso.

3. Construção dos oligonucleotídeos iniciadores

Os oligonucleotídeos iniciadores foram elaborados a partir das regiões conservadas das seqüências correspondentes a cada uma das 16 subclasses do gene *cry1* para a ordem Lepidoptera, obedecendo à lista de nomenclaturas das delta-endotoxinas de *B. thuringiensis* que são atualizadas constantemente e publicadas no site http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/toxins2.html. Para o alinhamento de todas as seqüências de cada subclasse utilizou-se o software *Clustal W* (THOMPSON et al., 1994) e o software *Gene Runner 3.0* (Hastings Software, Inc.) para a elaboração dos iniciadores. Subclasses *cry1*, para as quais foram encontradas mais de uma seqüência depositada no banco de dados citado, foram elaborados iniciadores também a partir de regiões não conservadas (Figura 1). A síntese dos oligonucleotídeos foi realizada pela *MWG (The Genomic Company)* e pela *Bio Synthesis (Oligo Data Sheet)*.

Tabela 1. Seqüências dos iniciadores para o gene *cry1* e suas subclasses analisadas.

Iniciador	Seqüências	Produto Amplificado (pb)	Temperatura de Pareamento (°C)
<i>cry1Aa</i> conservada	5' TATTTCTTGTGCGCTAACGC 3' 5' CCAAACACTGAAACATCTCTC 3'	426	50
<i>cry1Aa</i> não conservada	5' TTCGCATCATTCTCCTTAG 3' 5' CTGTCCACGATAAATGTTCC 3'	1035	50
<i>cry1Ab</i> conservada	5' GAGATGTTTCAGTGTTTGGAC 3' 5' GTCCCGTCAAGAACAGATAG 3'	799	50
<i>cry1Ab</i> não conservada	5' CGGGTAATCGCTCGTCTATC 3' 5' CTTACTTCTCGCCCATTATCC 3'	640	50
<i>cry1Ac</i> conservada	5' GGTGCTGGATTTGTGTTAGG 3' 5' TTCTTTCTATGCCCTGAGCC 3'	712	50
<i>cry1Ad</i> conservada	5' GAGATGTTTCAGTGTTTGGAC 3' 5' GCTGGCACACTATTATCCTG 3'	750	50
<i>cry1Ae</i> conservada	5' GCTCTTACAACCGCTATTCC 3' 5' TATTATCCTGTGGTGGTATTTCC 3'	838	50
<i>cry1Af</i> conservada	5' CCTTACAACCGCTATTCCCTC 3' 5' GTCCCGTCAAGAACAGATAG 3'	729	50
<i>cry1Ag</i> conservada	5' GAACAGTGCCCTTACAACCG 3' 5' GTGGTATTTGATGCCCTGAC 3'	558	50
<i>cry1Bb</i> conservada	5' CTTGTGTGTAGCCGAGGTG 3' 5' TCGCTCTCTCAATAATAATAGG 3'	484	50
<i>cry1Bc</i> conservada	5' TATTGGGCGTATTAGGTGTG 3' 5' TCGCTCTCTCAATAATAATAGG 3'	401	52
<i>cry1Be</i> conservada	5' TAGGGATACGGCTCTTGCTC 3' 5' CGATTCAAGTCTATGTCCAC 3'	742	54
<i>cry1Bf</i> conservada	5' AACAAACGAGAGATTATCCG 3' 5' CGTTCTGTTGTTTCTGGTGG3'	715	50
<i>cry1Ca</i> conservada	5' TGGTCAACTAACAAGGGAAG 3' 5' TCTACTCCTTCAACACCACG 3'	393	50
<i>cry1Ca</i> não conservada	5' AGAGCGGAGAAGAAGTGGAG 3' 5' CTTCTCTTCTACACAGTTGC 3'	559	50
<i>cry1Da</i> conservada	5' GAAGGGAAGGAAATACAGAGC 3' 5' GTTATTGGAGTGAAGAGTGTG 3'	670	50
<i>cry1Db</i> conservada	5' TTTATCCGTTTATGTTACAGGC 3' 5' GATGCGGAAATAGTTACGGG 3'	600	50
<i>cry1Ea</i> conservada	5' GAACTCAGCCATTAGAAGCC 3' 5' CCTCCTGTAAATCCTGGTCC 3'	609	48
<i>cry1Fa</i> não conservada	5' AATGTAGAGCCGTTTGTAGTG3' 3' CCCTCAAGTTATTTAGACCTG 3'	595	50

RESULTADOS

Na Figura 1 pode ser observada a distribuição das 16 subclasses do gene *cry1*, mais a família de genes *cry1* (*cry1Aa* conservada, *cry1Aa* não conservada, *cry1Ab* conservada, *cry1Ab* não conservada, *cry1Ac* conservada, *cry1Ad* conservada, *cry1Ae* conservada, *cry1Af* conservada, *cry1Ag* conservada, *cry1Bb* conservada, *cry1Bc* conservada, *cry1Be* conservada, *cry1Bf* conservada, *cry1Ca* conservada, *cry1Ca* não conservada, *cry1Da* conservada, *cry1Db* conservada, *cry1Ea* conservada, *cry1Fa* não conservada), na coleção de isolados mantida no LGBBA (Jaboticabal). Nota-se que as porcentagens de isolados de *B. thuringiensis* que amplificaram para cada subclasse foram relativamente altas nesta coleção. Assim, 55,7% dos isolados reagiram com o par de iniciadores gerais Gral *cry1*, e as subclasses *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1Ad*, *cry1Ae*, *cry1Af*, *cry1Ag*, e *cry1Bf*, *cry1Ca* e *cry1Fa* estão presentes em alta proporção de isolados, variando de 43,4% a 54,9%.

Para *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ca* e *cry1Fa*, foram observados os maiores números de isolados, quando utilizados os iniciadores provenientes de regiões não conservadas. Para as subclasses *cry1Ca* verificou-se diferença marcante quando utilizados iniciadores de regiões conservadas (8,2% dos isolados), em relação aos iniciadores para regiões não conservadas (54,1% dos isolados) (Figura 2).

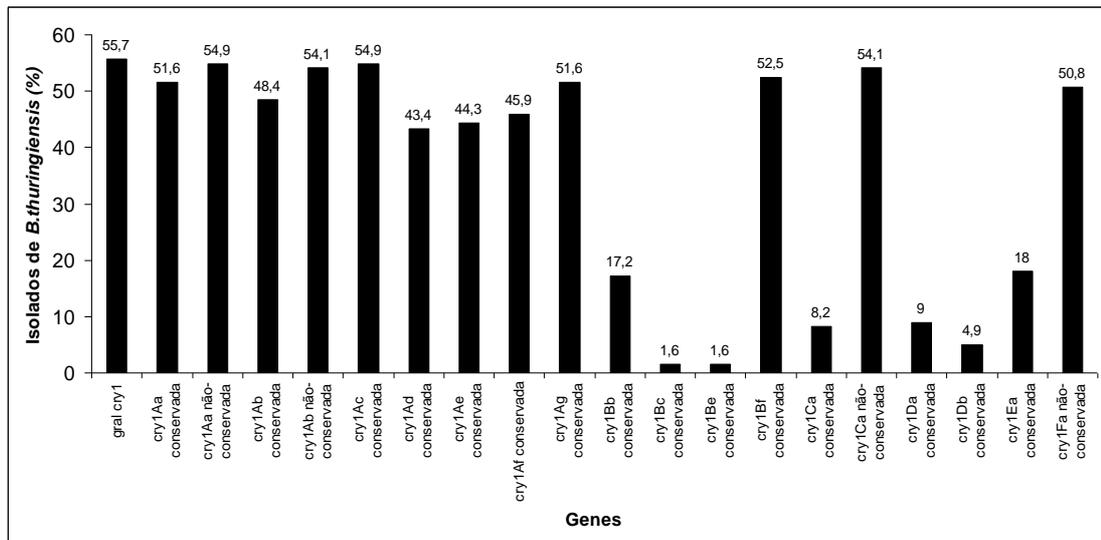


Figura 2. Porcentagem de isolados que apresentaram amplificação com os oligos das subclasses do gene *cry1* na Coleção de Jaboticabal, (LGBBA).

Provavelmente, os iniciadores elaborados a partir de regiões não conservadas poderiam amplificar maior número de diferentes genes desta subclasse, visto que, para *cry1Aa*, por exemplo, há várias subdivisões: *cry1Aa1*, *cry1Aa2*, *cry1Aa3* etc. As menores porcentagens foram obtidas para as subclasses *cry1Bb*, *cry1Bc*, *cry1Be*, *cry1Ca*, *cry1Da*, *cry1Db* e *cry1Ea*.

Verificou-se que a coleção de Jaboticabal se mostrou muito rica em isolados portadores de genes para *cry1A*, sugerindo uma tendência de manutenção dessa proporção de isolados nas análises futuras com os demais genes desta subclasse. O fato de 55,7% dos isolados da coleção, serem portadores do gene *cry1* indica sua aplicabilidade em programas de controle de pragas da ordem Lepidoptera.

Deve-se ressaltar que alguns isolados não apresentaram amplificação para a família *cry1*, com o par de iniciadores gerais Gral *cry1*, mas apresentaram para uma ou outra subclasse. Sugere-se então, que estes iniciadores não sejam tão gerais e que nem todas as subclasses do gene *cry1* foram contempladas e alinhadas por BRAVO et al. (1998), quando da elaboração desse par de iniciadores, o que se confirma pela

crescente descoberta de novos genes *cry1*, agregados constantemente aos bancos de dados de seqüências.

Na coleção de Piracicaba (ESALQ), nota-se que a distribuição das subclasses seguiu um perfil muito próximo ao da coleção de Jaboticabal, porém, com porcentagens menores de isolados dentro de cada subclasse. Observou-se amplificação em 42,6% dos isolados com os iniciadores Gral *cry1*, mas 4,5; 4,2 e 3,2% dos isolados não apresentaram amplificação para *cry1Ab*, *cry1Ae* e *cry1Ag*, respectivamente (Figura 3).

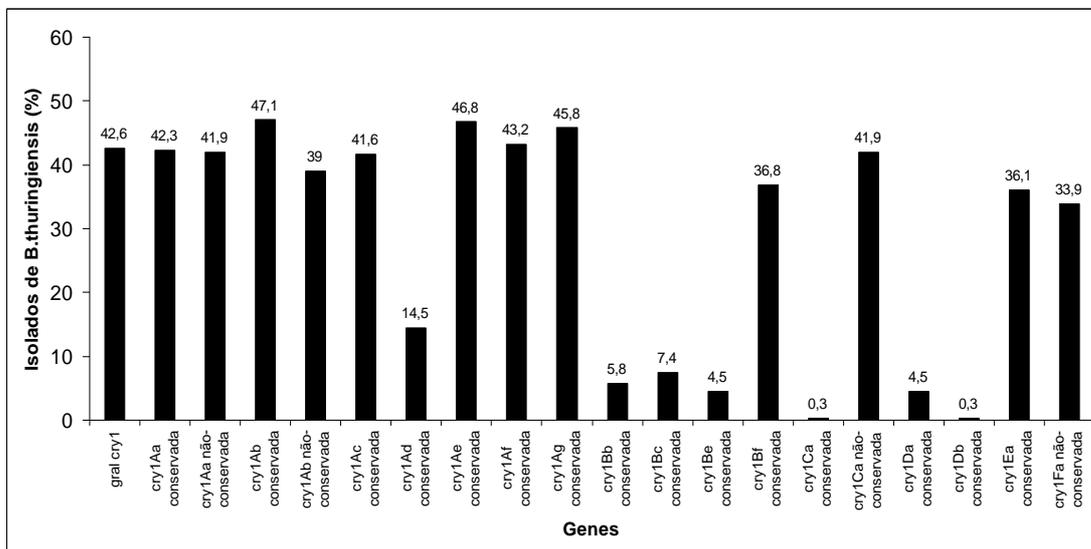


Figura 3. Porcentagem de isolados que apresentaram amplificação com os oligos das subclasses do gene *cry1* na Coleção de Piracicaba (ESALQ).

Houve baixa porcentagem de isolados (14,5%) portadores de *cry1Ad*, quando comparada à coleção de Jaboticabal (43,4%). No entanto, *cry1B*, continuou sendo a menos abundante seguida da subclasse *cry1D*.

Para *cry1Ca*, o par de iniciadores para a região não conservada apresentou maior porcentagem de isolados (41,9%), como na coleção de Jaboticabal (Figura 2), contra 0,3% para os iniciadores da região conservada.

Comparando-se a coleção de Piracicaba (Figura 3) à coleção de Jaboticabal (Figura 2), maior porcentagem (36,1%) de isolados apresentou *cry1Ea*, enquanto a proporção de isolados contendo *cry1Fa* foi menor (33,9%).

Assim como a coleção de Jaboticabal, a coleção de Piracicaba é também uma excelente fonte de isolados efetivos no controle biológico de insetos da ordem Lepidoptera. No entanto, não é descartada a possibilidade de que os isolados das coleções referidas apresentem amplificação para as outras subclasses do gene *cry1*, ou para outras famílias específicas para outras ordens de insetos.

A coleção de Sete Lagoas (EMBRAPA) apresentou um perfil de distribuição das subclasses estudadas totalmente diferente das outras duas coleções (Figura 4). Apesar de ser a coleção com maior número de isolados (641), foi a que apresentou a menor porcentagem de isolados portadores da subfamília *cry1A*, considerada a mais comum entre os isolados de *B. thuringiensis*. Apenas 18,6% dos isolados desta coleção apresentaram amplificação para o gene *cry1* com os iniciadores gerais, e somente para a subclasse *cry1Ab*, com iniciadores para região conservada, é que houve maior porcentagem de isolados (38,5%). No entanto, a distribuição de isolados portadores de *cry1B* se apresentou mais evidente que nas outras coleções (17 a 19% dos isolados) (Figura 4).

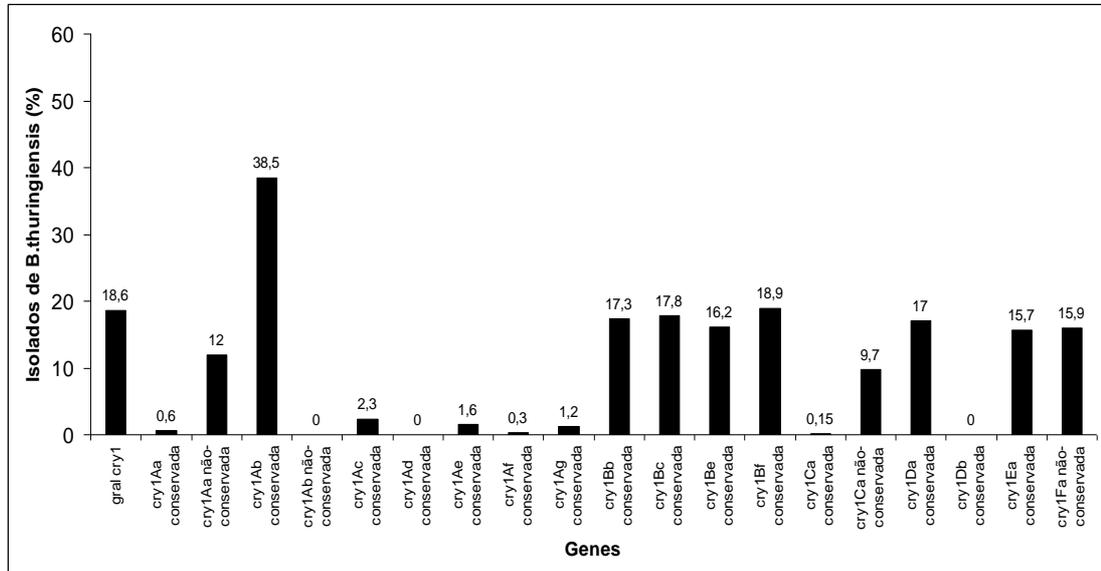


Figura 4. Porcentagem de isolados que apresentaram amplificação com os oligos das subclasses do gene *cry1* na Coleção de Sete Lagoas (EMBRAPA).

Esta coleção apresenta ainda, um conjunto peculiar de isolados caracterizando um banco que deve ser intensamente explorado, visto que estes isolados de *B. thuringiensis* podem ser portadores de outras famílias de genes *cry*, bem como de outras subclasses com diferentes espectros de atuação contra insetos pragas, ou mesmo vetores de doenças.

Na Figura 5 pode ser observada a distribuição das 16 subclasses estudadas e da família *cry1*, considerando as três coleções conjuntamente, ou seja, a distribuição dentro dos 1073 isolados de *B. thuringiensis*. Essa distribuição foi mais homogênea entre as subclasses, com maior porcentagem de isolados portadores dos genes *cry1Ab* (42,12%) e menor porcentagem de isolados que contém *cry1Db* (0,6%), verificando-se ainda que o banco de isolados de *B. thuringiensis* em estudo contempla todas as subclasses do gene *cry1*.

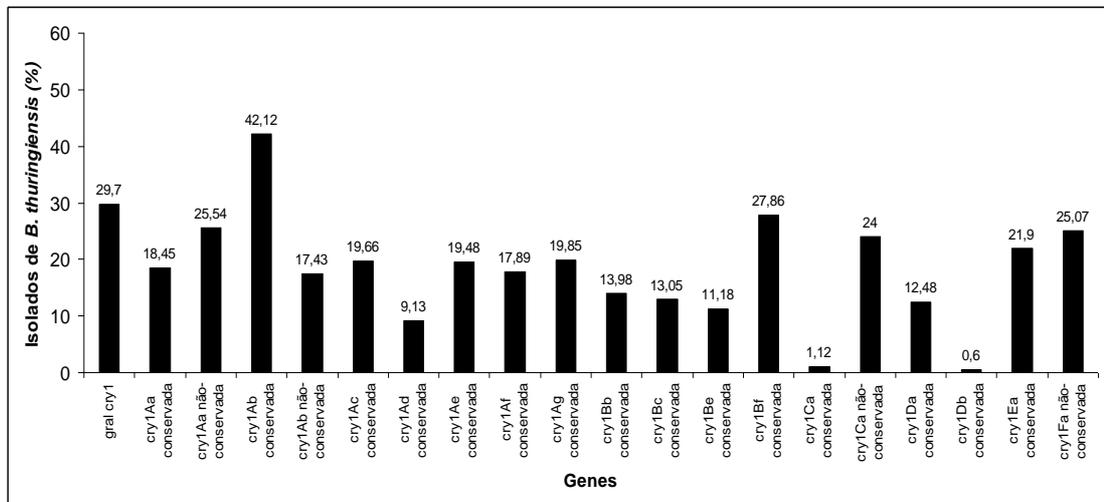


Figura 5. Porcentagem de isolados que apresentaram amplificação com os oligos das subclasses do gene *cry1* (iniciadores específicos) e *cry1* (iniciadores gerais) presentes nas coleções de isolados de *B. thuringiensis* em estudo.

A caracterização específica destes isolados por PCR produziu diferentes perfis de genes *cry1*. Devido ao tamanho da coleção, os isolados foram agrupados de acordo com o número de subclasses *cry1* exibido por cada um, conforme se observa na Figura 6, e não pelas combinações das subclasses que compõem cada um dos perfis.

Apesar da maioria dos isolados terem apresentado uma ou mais subclasses do gene *cry1*, uma grande parte (453 - 42,2% dos isolados) não apresentou amplificação para nenhuma delas. Cerca de 20% apresentou uma das 16 subclasses analisadas, sendo a *cry1Ab* a mais predominante.

Isolados que amplificaram de 9 a 13 genes constituem 22,2% dos isolados, sendo que a maioria apresenta os perfis de combinação de 10 e 11 subclasses. Ressalta-se aqui, a presença de um isolado que apresentou amplificação para 14 subclasses, não amplificando apenas para os genes *cry1Ae*, *cry1Be* e *cry1E*. Um número mais reduzido (10%) apresentou perfis contendo de três a oito subclasses.

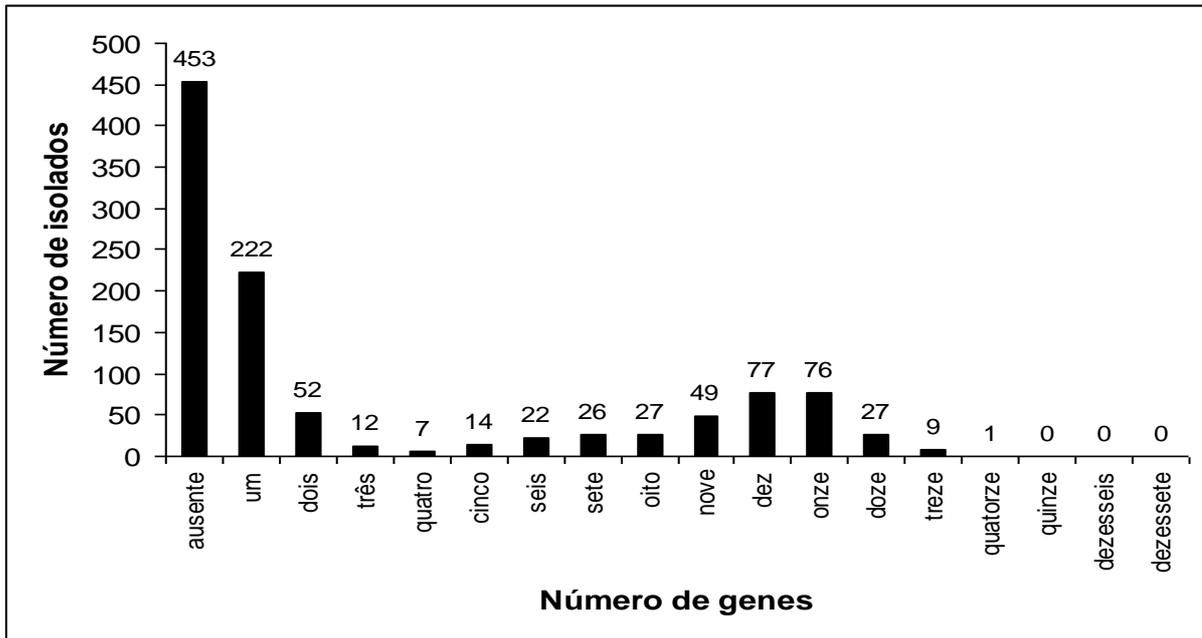


Figura 6. Número de subclasses do gene *cry1* presentes nos isolados da coleção em estudo.

DISCUSSÃO

Poucos estudos têm relatado uma caracterização detalhada de coleções de *B. thuringiensis* em termos de conteúdo de genes *cry*. Trabalhando com amostras de solos provenientes de Taiwan, CHAK et al. (1994) obtiveram 225 isolados dos quais 221 (98,2%) continham genes *cry1*. Destes, somente cinco diferentes perfis de genes *cry* foram encontrados usando iniciadores específicos para *cry1*, *cry3*, e *cry4*. Nenhum dos isolados apresentou genes *cry3*. Ao analisarem 215 isolados obtidos de amostras de áreas de Israel, pelo uso de iniciadores gerais e específicos para genes *cry1*, *cry2*, *cry3*, *cry4*, *cry7*, e *cry8*, BEN-DOV et al. (1996) encontraram genes *cry1* representados

por 16 diferentes perfis. BRAVO et al. (1998) relataram que de um total de 496 isolados obtidos de diferentes ecossistemas no México, 246 (49,6%) continham genes *cry1* apresentando 35 diferentes perfis usando iniciadores específicos para genes *cry1*, *cry3*, e *cry7*. Também FERRANDIS et al. (1999), na Espanha, verificaram que de 223 isolados de *B. thuringiensis*, 121 (54,3%) continham gene *cry1*, e encontraram ainda 16 diferentes perfis nesses isolados após terem realizado análises com os iniciadores para os genes *cry1*, *cry2* e *cry4*.

O presente estudo encontrou 16 diferentes subclasses do gene *cry1* em 620 dos 1073 isolados em estudo, provenientes de diferentes ecossistemas no Brasil, usando iniciadores específicos para os genes *cry1*. A grande variabilidade e distribuição de *B. thuringiensis* nos estudos em diversos países sugerem que as diferenças ecológicas do local de origem e/ou as relações de co-evolução tenham favorecido a expressão de diferentes padrões de genes *cry1*.

As análises permitiram verificar a presença de alguns genes *cry1* em combinação com outros genes *cry1* específicos, tais como: *cry1Ac/cry1Ab*, *cry1Aa/cry1Ac*, *cry1Ab/cry1Ac* e *cry1C/cry1D*. A figura 5 demonstra o número linhagens com diferentes quantidades de genes *cry*.

CHAK et al. (1994) e BRAVO et al. (1998) encontraram padrão similar e, em ambos os trabalhos, o perfil mais comum de gene *cry1* correspondeu aos genes *cry1Aa*, *cry1Ab* e *cry1Ac*, o que pôde ser observado, também, no presente estudo, nas coleções de Jaboticabal e Piracicaba, que apresentaram padrão semelhante quanto à distribuição dos perfis de genes *cry1*. Ainda, CHAK et al. (1994) encontraram importante frequência entre os perfis *cry1Aa/cry1Ac* e *cry1C/cry1D* em 21,3 e 17,7% dos isolados, respectivamente. No mesmo contexto, FERRANDIS et al. (1999) mostraram que 93% dos isolados com presença do gene *cry1C* continham o gene *cry1D* no seu genoma, sugerindo então, alta ligação genética entre esses dois genes.

Segundo SANCHIS et al. (1988) a linhagem padrão de *B. thuringiensis* var. *aizawai* 7.29 contém genes *cry1C* e *cry1D* no mesmo replicon. As análises aqui apresentadas estão de acordo com o relato desses autores, visto que nas três coleções, a maioria dos isolados que apresentaram o gene *cry1C* também continham o

gene *cry1D*. Todos esses resultados indicam que os pares de genes mencionados encontram-se juntos na natureza, provavelmente fazendo parte do mesmo replicon, localizados em um megaplasmídeo (GONZÁLES et al., 1982; SANCHIS et al., 1988).

A ocorrência conjunta de alguns desses genes *cry* pode minimizar problemas relacionados a inseticidas baseados em *B. thuringiensis*, devido ao seu espectro de ação limitado quando comparado aos inseticidas químicos. Este é um fator limitante já que as culturas agrícolas são atacadas simultaneamente por diferentes pragas e, às vezes, por insetos de diferentes ordens. Portanto, uma importante característica encontrada neste estudo é a presença de mais de um gene *cry1* na maioria dos isolados (Fig. 5). De 621 isolados, 399 apresentaram duas ou mais subclasses do gene *cry1*. No entanto, deve-se ressaltar que, para alguns genes *cry1*, os iniciadores elaborados podem ter amplificado mais de uma subclasse, por estarem em uma região de homologia entre elas, levando a um número superestimado de genes em alguns isolados; como exemplo, o isolado que apresentou 14 subclasses (Figura 6). Isso só poderia ser verificado através do seqüenciamento dos produtos amplificados e comparação com as seqüências depositadas no banco de dados.

Há alguns genes *cry* que são comumente identificados em todas as coleções do mundo, tais como os genes *cry1*, e outros são mais freqüentes em uma região que em outra. Por exemplo, os genes *cry1A*, *cry1C*, *cry1D* e genes *cry2* foram mais comumente encontrados em isolados da Ásia (BEN-DOV et al., 1997; KIM, 2000; ZHANG et al., 2000) que naqueles da América Latina (BRAVO et al., 1998).

A variabilidade gênica nas coleções analisadas destaca as coleções de Jaboticabal e Piracicaba, como fonte de isolados promissores para uso em programas de Controle Biológico de pragas da ordem Lepidoptera, diferentemente do observado para a coleção de Sete Lagoas, na qual as freqüências das subclasses estudadas foram relativamente baixas (abaixo de 20%), com destaque somente para o gene *cry1Ab*, presente em 38,5% dos isolados desta coleção.

Desde que a resistência a *B. thuringiensis* em populações de insetos da ordem Lepidoptera tem sido relatada (FERRÉ et al., 1991; TABASHNIK, 1994), há um grande interesse no isolamento de novas linhagens de *B. thuringiensis* cujas propriedades

tóxicas diferem daquelas já usadas como bioinseticidas. Os resultados obtidos aqui mostraram que o Brasil se apresenta como uma fonte potencialmente rica em isolados de *B. thuringiensis*, mas a possibilidade em usar essas toxinas a partir de novos isolados requer ainda estudos mais detalhados.

CONCLUSÕES

- As coleções analisadas possuem alta variabilidade gênica
- As coleções de Jaboticabal e Piracicaba são fontes de isolados para uso em programas de controle biológico de pragas da ordem Lepidoptera e para obtenção de gene *cry1* para transgênese.
- A coleção de Sete Lagoas se apresenta como fonte de isolados para uso em programas de controle biológico contra outras ordens de insetos.
- O Brasil apresenta uma grande diversidade gênica nos isolados de *B. thuringiensis* para o controle biológico de lepidópteros.

REFERÊNCIAS

BEN-DOV, E.; EIVAN, M.; PERLEG, N.; BOUSSIBA, S.; ZARISTSKY, A. Restriction map of the 125-kilobase plasmid of *Bacillus thuringiensis* subsp *israelensis* carrying the genes that encode delta-endotoxins active against mosquito larvae. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.62, n.9, p.3140-3145, 1996.

BEN-DOV, E.; ZARISTSKY, A.; DAHAN, E.; BARAK, Z.; SINAI, R.; MANASHEROB, R.; KHAMRAEV, A.; TROITSKAYA, E.; DUBITSKY, A.; BEREZINA, N.; MARGALITH, Y. Extended screening by PCR for seven *cry*-group genes from field-collected strains of *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.63, n.12, p.4883-4890, 1997.

BERÓN C.M.; SALERNO, G.L. Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates from Argentina that are potentially useful in insect pest control. **BioControl**, Netherlands, v.51, n.6, p.779-794, 2006.

BOURQUE, S.N.; VALERO, J.R.; MERCIER, J; LAVOIE, M; LEVESQUE, R. C. Multiplex polymerase chain reaction for detection and differentiation of the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.59, n.2, p.523-527, 1993.

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

CERÓN, J.; ORTIZ A.; QUINTERO, R., GÜERECAL, L.; BRAVO, A. Specific PCR primers directed to identify *cryI* and *cryIII* genes within *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, n.11, p.3826-3831, 1995.

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

CHAK, K.F., CHAO, D.C., TSENG, M.Y., KAO, S.S., TUAN, S.J., FENG, T.Y. Determination and distribution of *cry*-type genes of *Bacillus thuringiensis* isolates from Taiwan. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.60, n.7, p.2415-2420, 1994.

FEITELSON, J.S.; PAYNE, J.; KIM, L. *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. **Nature Biotechnology**, New York, v.10, p.271-275, 1992.

FERRANDIS, M.D.; JUÁREZ-PÉREZ, V.M.; FRUTOS, R.; BEL, Y.; FERRÉ, J. Distribution of *cryI*, *cryII* and *cryV* genes within *Bacillus thuringiensis* isolates from Spain. **Systematic and Applied Microbiology**, Jena, v.22, n.2, p.179-185, 1999.

FERRÉ, J.; REAL, M.D.; VAN RIE, J.; JANSSENS, S.; PEFFEROEN, M. Resistance to the *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide in a field population of *Plutella xylostella* is due to a change in a midgut membrane receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.88, n.12, p.5119-5123, 1991.

GONZALEZ, J.M. JR.; BROWN, B.J.; CARLTON, B.C. Transfer of *Bacillus thuringiensis* plasmids coding for delta-endotoxin among strains of *B. thuringiensis* and *B. cereus*.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Washington, v.79, n.22, p.6951-6955, 1982.

IBARRA, J.E.; DEL RINCON, M.C.; ORDUZ, S.; NORIEGA, D.; BENINTENDE, G.; MONNERAT, R.; REGIS, L.; OLIVEIRA, C.M.; LANZ, H.; RODRIGUEZ, M.H.; SANCHEZ, J.; PENA, G.; BRAVO, A. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Latin America with insecticidal activity against different mosquito species. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n.9, p.5269–5274, 2003.

JARA, S.; MADUELL, P.; ORDUZ, S. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains in the maize and bean phylloplane and their respective soils in Colombia. **Journal of Applied Microbiology**, Oxon, v.101, n.1, p.117–124, 2006.

KIM, H.S. Comparative study of the frequency, flagellar serotype, crystal shape, toxicity, and *cry* gene contents of *Bacillus thuringiensis* from three environments. **Current Microbiology**, New York, v.41, n.4, p.250-256, 2000.

MONNERAT, R.; BRAVO, A. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. In: MELLO, I.S., AZEVEDO, J.L. (Eds.). **Controle Biológico**. Jaguariúna: Embrapa, 1999. v.3, p.163-200.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, DW. **Molecular cloning**: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.

SANCHIS, V.; LERECLUS, D.; MENO, G.; CHAUFAX, J.; LECADET, M.M. Multiplicity of δ -endotoxin genes with different specificities in *Bacillus thuringiensis aizawai* 7.29. **Molecular Microbiology**, Oxon, v.2, n.3, p.393-404, 1988.

SAUKA, D.H.; COZZI, J.G.; BENINTENDE, G.B. Detection and identification of *cry1I* genes in *Bacillus thuringiensis* using polymerase chain reaction and restriction fragment

length polymorphism analysis. **Current Microbiology**, New York, v.52, n.01, p.60–63, 2006.

TABASHNIK, B.E. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual review of entomology**, Palo Alto, v.39, p.47-79, 1994.

TABASHNIK, B.E.; CUSHING, N.L.; FINSON, N.; JOHNSON, M.W. Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.83, n.5, p.1671-1676, 1990.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J.; CLUSTAL, W. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, England, v.22, n.22, p.4673-4680, 1994.

VALADARES-INGLIS, M.C.C.; SHILER, W.; DESOUSA, M.T. Engenharia genética de microrganismos agentes de controle biológico. In: MELLO, I.S., AZEVEDO, J.L. (Eds.). **Controle Biológico**. Jaguariúna: Embrapa, 1998. v.1, p.201-230.

VILAS-BÔAS, G.F.L.T. **Diversidade e estrutura genética de populações de *Bacillus thuringiensis* e de *Bacillus cereus***. 2002. 103f. Tese (Doutorado – Microbiologia Agropecuária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias “FCAV”, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2002.

VILAS-BÔAS, G.T.; LEMOS, M.V. Diversity of *cry* genes and genetic characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from Brazil. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.50, n.8, p.605-613, 2004.

ZHANG, H.Y.; YU, Z.N.; DENG, W.X. Composition and ecological distribution of *Cry* proteins and their genotypes of *Bacillus thuringiensis* isolates from warehouses in China. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.76, n.3, p.191-197, 2000.

CAPÍTULO 3 – ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Bacillus thuringiensis* DE DIFERENTES COLEÇÕES E REGIÕES BRASILEIRAS

INTRODUÇÃO

Além da ação entomopatogênica, *Bacillus thuringiensis* foi recentemente descrito em casos de doenças gastrointestinais em seres humanos (JACKSON et al., 1995; NOGUCHI, 1993) e, em algumas linhagens desta bactéria foi detectada a presença de genes sabidamente envolvidos na patogênese provocada por *B. cereus* (FREDERIKSEN et al., 2006; HANSEN & HENDRIKSEN, 2001; HSIEH et al., 1999).

As linhagens de *B. cereus* secretam uma grande quantidade de enzimas extracelulares e toxinas que são, supostamente, importantes fatores para a sua patogenicidade. O *B. cereus* pode expressar pelo menos duas enterotoxinas distintas de múltiplos-componentes. A enterotoxina hemolítica denominada HBL é o produto de um operon, que inclui os genes *hblA*, *hblD*, e *hblC*, que codificam o componente de ligação (B) e os componentes líticos, L1 e L2, respectivamente (HSIEH et al., 1999). Adicionalmente, um operon da enterotoxina não-hemolítica, NHE, de *B. cereus*, também foi caracterizado e é composto por três diferentes proteínas NheA, NheB e NheC, codificadas pelos genes *nheA*, *nheB* e *nheC* (GRANUM et al., 1999).

Outros fatores de virulência são produzidos por linhagens de *B. cereus* e incluem três tipos de fosfolipases C, cada uma com um mecanismo de ação diferente, o que se supõe contribuir para lesar o tecido por induzir a degradação dos neutrófilos (DING et al., 1995).

O gene da fosfolipase C é regulado pelo ativador de transcrição PlcR. Os genes PlcR-regulados estão envolvidos no controle da expressão de fatores extracelulares de virulência e na patogenicidade, incluindo as enterotoxinas, em *Bacillus* spp. Embora, provavelmente, o gene *plcR* esteja presente em todos os membros do grupo de *B.*

cereus, e o polipeptídeo codificado por *plcR* de *B. cereus* seja funcionalmente equivalente ao de *B. thuringiensis*, em *B. anthracis*, por exemplo, o polipeptídeo codificado por *plcR* é truncado e não funciona como um ativador de transcrição (AGAISSE et al., 1999). Estes fatos implicam na taxonomia entre membros do grupo de *B. cereus*, nas propriedades de virulência destas bactérias e na segurança do uso de bioinseticidas à base de *B. thuringiensis*.

Análises genômicas têm demonstrado que uma fração dos genomas bacterianos das espécies (5 a 15%) origina-se de outra espécie, pela transferência de segmentos homólogos ou heterólogos, incluindo elementos transponíveis nos plasmídeos ou fagos (MAJEWSKI & COHAN 1999; OCHMAN et al., 2000).

A detecção de mudanças nas seqüências de DNA de diferentes indivíduos pode possibilitar a realização de estudos de diversidade genética de regiões conservadas não específicas, como também de regiões específicas entre indivíduos de uma mesma espécie ou mesmo entre populações e espécies diferentes.

A técnica de RFLP, constitui uma estratégia relativamente rápida e simples, que se baseia na presença ou ausência de seqüências específicas de quatro a oito pares de bases, reconhecidas e clivadas pelas enzimas de restrição, podendo variar entre diferentes indivíduos, gerando assim os polimorfismos. Diferenças nas seqüências de DNA dos indivíduos podem também resultar a partir de inserções, deleções ou outros rearranjos (translocações, inversões) que alterem a distância entre pares de sítios de restrição ou mesmo de suas seqüências.

Estudos que verificam a abundância, a distribuição e a diversidade de isolados de *B. thuringiensis* são importantes não somente para a busca de novas alternativas de controle de insetos, através de isolados de linhagens com especificidade diferentes das atualmente conhecidas, mas também para responder questões ligadas à evolução e as relações ecológicas desta espécie. O relacionamento genético entre isolados selvagens de *B. thuringiensis* foi analisado após a digestão com as enzimas *NotI* e *Ascl* e somente nove fenótipos visualizados por eletroforese de campo pulsátil foram observados entre todos os isolados, indicando uma estrutura clonal para a população de *B. thuringiensis* do nordeste da Polônia, por exemplo (SWIECICKA & MAHILLON, 2005).

Analisando a atividade hemolítica de populações simpátricas de *B. cereus* e *B. thuringiensis*, usando MLEE, VILAS-BÔAS et al. (2002), encontraram que as populações de uma dada espécie de *Bacillus* – *B. thuringiensis* ou *B. cereus* – de diferentes amostras de solo foram mais similares geneticamente umas com as outras do que com as populações da outra espécie de *Bacillus* da mesma amostra de solo. Os resultados sugeriram também que a taxa de fluxo gênico foi maior entre as linhagens da mesma espécie, mas que as trocas genéticas interespecíficas, isto é, entre *B. cereus* e *B. thuringiensis* foram, apesar disso, possíveis.

As proteínas Cry, encontradas em *B. thuringiensis* e amplamente estudadas no controle microbiano de insetos-praga, não são tóxicas ao homem e proporcionam inúmeras vantagens, como especificidade ao inseto-alvo, efeito não poluente ao ambiente, inocuidade a mamíferos e vertebrados e por não serem fitopatogênicas. Contudo, a potencialidade dos bioinseticidas à base de *B. thuringiensis* é aumentada quando se utiliza, além dos cristais, esporos da bactéria nas formulações.

Considerando a similaridade taxonômica de linhagens de *B. cereus* e de *B. thuringiensis*, a introdução de um grande número de esporos de *B. thuringiensis* em produtos alimentícios, por meio de pulverizações para controle de pragas agrícolas, pode levar a intoxicações alimentares (FREDERIKSEN et al., 2006), uma vez que seja comprovada a possibilidade de trocas genéticas entre esses organismos.

Levando em consideração esta abordagem, o trabalho teve como objetivo caracterizar isolados de *B. thuringiensis* quanto a presença de enterotoxinas HBL, NHE e o regulador pleitrópico PlcR, por verificação biomolecular, avaliando a variabilidade genética bem como a estruturação genética de populações de *B. thuringiensis*.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Linhagens bacterianas

Foram analisados 650 isolados de *B. thuringiensis* obtidos de vários pontos do território brasileiro, cedidos pelo Prof. Dr. Sérgio Batista Alves do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos (Depto. de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da ESALQ/USP) Piracicaba/SP, pelo Dr. Edílson Paiva (Núcleo de Biologia Aplicada da EMBRAPA Milho e Sorgo) Sete Lagoas/MG e pelo Prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos (Depto. de Biologia Aplicada a Agropecuária da FCAV/UNESP), Jaboticabal/SP. Todos os isolados encontram-se em estoque no Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada na FCAV/UNESP - Jaboticabal.

2. Extração de DNA

Os isolados de *B. thuringiensis* foram previamente cultivados em placas, contendo meio NA sólido, por 12 h a 30°C. Para cada isolado uma colônia foi ressuspensa em 1 ml de água estéril em tubos de microcentrífuga e o material genético foi extraído pelo Kit InstaGene Matrix (Bio-Rad), conforme instruções do fabricante. As amostras de DNA obtidas foram estocadas em congelador e mantidas a 20°C até a utilização.

3. Detecção da presença dos genes *hblA*, *nheB* e *C* e *plcR* nos isolados

O material genético dos isolados foi submetido à amplificação por PCR com iniciadores específicos para os genes *hblA*, *plcR*, *nheB* e *C*.

As reações de amplificação foram conduzidas em volumes de 20 μ l contendo: 30 ng de DNA molde, 250 μ M de uma solução de dNTPs (10 mM); 2,0 mM de $MgCl_2$ (para *hblA* e *nheB* e C) e 1,5 mM de $MgCl_2$ (para *plcR*); 0,5 μ M de cada iniciador; 2,0 U da enzima Taq DNA polimerase (Fermentas[®]); solução tampão para a reação de PCR (1X) e água destilada Milli-Q previamente esterilizada (qsp 20 μ l). As seqüências dos iniciadores e as condições de amplificação estão descritas na Tabela 1.

Após a realização das amplificações as amostras foram aplicadas em gel de agarose (1,5%), visualizadas sob luz UV e documentadas em equipamento fotodocumentador (GEL-DOC 2000 - Bio-Rad[®]), através do programa *Quantity-one*.

Tabela 1. Seqüências dos iniciadores e condições de amplificação .

Gene	Seqüências	Condições de amplificação				Produto pb
		D	P	E	nº de ciclos	
<i>hblA</i>	5´gct aat gta gtt tca cct gta gca ac 3´	94°C	65°C	72°C	30	883
	5´aat cat gcc act gcg tgg aca tat aa 3´	30s	60s	60s		
<i>nheBC</i>	5´ tat tat cgg ttc atc tgt tgc g 3´	95°C	48°C	72°C	37	1168
	5´ gta tct ttc gcc att cta tcg c 3´	60s	60s	90s		
<i>plcR</i>	5´ gtc atc aat cgg aag taa gtc g 3´	94°C	55°C	72°C	30	684
	5´ caa ttt ctg ctc tat cac acc c 3´	45s	45	60s		

D: desnaturação; P: pareamento; E: extensão

4. Análise de polimorfismo nos genes *hblA*, *nheB* e *C* e *plcR* por PCR-RFLP

Os amplicons gerados com os iniciadores específicos para os genes *hblA*, *nheBC* e *plcR* foram digeridos com enzimas de restrição. Para cada gene foram utilizadas duas enzimas: *MbolI* e *XbaI* para o gene *hblA*; *AluI* e *HaeIII* para o gene *plcR* e *DraI* e *TaqI* para os genes *nheB* e *C*. Para a escolha das enzimas de restrição utilizadas na técnica PCR-RFLP, o posicionamento das seqüências dos iniciadores específicos para os referidos genes foram analisadas no “software pDRAW 32” (AcaClone Software), o qual fornece esta informação bem como, os palíndromos sobre os quais as enzimas de restrição vão atuar, dentro das regiões amplificadas.

As reações de restrição foram conduzidas em um volume de 10 µl, contendo 4,0 µl do produto amplificado de cada isolado, 2,0 µl do tampão específico para cada enzima: tampão Tango 1X [33mM Tris-acetato (pH 7,0), 10mM Acetato de Magnésio, 66mM Acetato de Potássio, 0,1 mg/ml BSA] para as enzimas *XbaI*, *DraI*, *HaeIII* e *AluI*; tampão B 1X [10mM Tris-HCl (pH 7,5), 10mM MgCl₂, 0,1 mg/ml BSA] para a enzima *MbolI*; e tampão TaqI 1X [10mM Tris-HCl (pH 8,0), 5mM MgCl₂, 100mM NaCl, 0,1 mg/ml BSA] para a enzima *TaqI*; 5 U das enzimas e água Milli-Q estéril q.s.p. 10 µl. As reações foram incubadas a 37°C durante 4 h para as enzimas *MbolI*, *XbaI*, *AluI* e *DraI*; a 37°C durante 1 h para a enzima *HaeIII* e a 65°C durante 4 h para a enzima *TaqI*.

O material genético dos isolados, digerido com as enzimas, foi aplicado em gel de agarose (1,5%), contendo brometo de etídeo (0,5 µg/ml) e submetido à eletroforese horizontal por 3 h, a 100 V, conduzidas em tampão TEB 1X (Tris 89 mM, EDTA 2,5 mM e Acido Bórico 89 mM com pH 8,3), também adicionado de brometo de etídeo (0,5 µg/ml). Em todas as eletroforeses realizadas foi adotado o emprego de uma amostra de DNA, com fragmentos de tamanhos conhecidos, múltiplos de 1kb denominado “1kb DNA ladder”, produzida pela Fermentas[®], a qual serviu como referência de migração eletroforética para verificação dos tamanhos dos fragmentos obtidos nas reações de amplificação.

Os géis de agarose foram visualizados sob luz UV e fotodocumentados em equipamento GEL-DOC 2000 Bio-Rad, através do software Quantity-one para posterior análise dos polimorfismos nos sítios de restrição.

A presença ou ausência dos sítios de restrição, para cada enzima foi utilizada para definir a existência de alelos para um loco particular (no caso os genes *hblA*, *plcR* e *nheBC*) e a combinação destes alelos, quando diferentes, definiram os haplótipos.

Para a análise de haplótipos, cada isolado recebeu um número (1, 2, 3, 4, 5) referente ao alelo gerado pela ausência ou presença dos respectivos sítios de restrição para cada enzima. A combinação destes alelos, para os genes analisados, representou o haplótipo gerado para cada isolado.

5. Análises estatísticas

5.1. Análise da diversidade genética e da estrutura de grupos

Análises entre grupos de isolados foram conduzidas para se testar a estruturação geográfica dos isolados de *B. thuringiensis* analisados. Comparações duas a duas entre estatísticas Φ [equivalente à estatística F (WRIGHT, 1951)] foram utilizadas para descrever que proporção da variação genética total do loco está relacionada à diferença entre dois grupos. Os haplótipos de *B. thuringiensis* foram agrupados por Coleção, sendo o grupo 1 representado por isolados da coleção de Jaboticabal; grupo 2 por isolados da coleção de Piracicaba; e grupo 3, por isolados de Sete Lagoas. Os haplótipos de *B. thuringiensis* foram agrupados também por amostra de origem (regiões) em 4 grupos: grupo 1, representado pelos isolados da região Centro-Oeste; grupo 2, representado pelas regiões Norte-Nordeste; grupo 3 pelos isolados da região Sul; e o grupo 4, pelos isolados da região Sudeste. Nesta análise desconsiderou-se os isolados provenientes de outros países e isolados catalogados sem origem. A análise estatística F_{st} foi calculada pela análise de variância molecular

(AMOVA) usando o "software" Arlequin (DEMPSTER et al., 1977; EXCOFFIER & SLATKIN, 1995; WEIR, 1996; LANGE, 1997; EXCOFFIER et al., 2005).

Como este tipo de análise estima os componentes de variância considerando o número de diferenças entre os haplótipos moleculares (WEIR, 1996) o parâmetro F_{st} varia de 0.0 (quando os grupos parecem homogêneos) a 1.0 (quando são heterogêneos), estimando assim toda a variação que ocorre entre os grupos de isolados de *B. thuringiensis*, em relação às coleções e às regiões de origem.

5.2. Análise multivariada

Realizou-se também uma análise exploratória de dados (multivariada), aplicando-se a análise de agrupamento (AA), usando-se o programa computacional "STATISTICA versão 6.0", para verificação dos agrupamentos entre os isolados das coleções e regiões diferenciadas.

RESULTADOS

Caracterização do conteúdo gênico de enterotoxinas

A caracterização do conteúdo dos genes *hblA*, *plcR* e *nheB* e *C* foi realizada para os 650 isolados brasileiros utilizando iniciadores específicos para os mesmos. Destes, 587 isolados apresentaram o gene *hblA*, 496 o gene *plcR* e 350 os genes *nheB* e *C* (Figura1). Muitos isolados (242) evidenciaram a presença dos quatro genes conjuntamente; 195 isolados possuem a combinação *hbl+plc*; 76 a combinação *hbl+nhe* e 22 isolados possuem os genes *plc+nhe* em seu genoma. Apenas oito isolados (1%) não amplificaram com nenhum dos iniciadores utilizados, evidenciando ou a ausência

desses genes em tais isolados ou mutações que possam impedir o pareamento dos iniciadores utilizados.

Analisando as três coleções em conjunto, foi verificado que a maior porcentagem de ocorrência das enterotoxinas se dá na combinação *hbl+plc+nhe* (37%), seguida da combinação *hbl+plc* (30%) (Figura 1). A menor porcentagem de ocorrência foi verificada quando se avaliou a ocorrência dos genes *nheB* e *C* isoladamente. Notou-se ainda que o gene *hblA*, codificador da enterotoxina hemolítica HblA, faz parte do genoma da maioria dos isolados brasileiros.

Na coleção de Jaboticabal (A) a maior ocorrência dos genes é da combinação *hbl+nhe*, seguida pela *hbl+plc+nhe* (Figura 1). Somente 9% dos isolados apresentaram a combinação *hbl+plc*.

Analisando os isolados que apresentam pelo menos um dos genes analisados, a maior porcentagem de ocorrência nesta coleção foi observada para o gene *hblA* (21%) e a menor para o gene *plcR*, com apenas um representante (BR₃). O operon *nheBC* aparece sozinho em 3 isolados (BR₄₆, BR₄₈ e BR₅₂) e apenas dois isolados não continham nenhum dos genes analisados (BR₃₈ e Br₉₁).

A coleção de Piracicaba (B) é muito rica, tanto de *hblA* como de *plcR*, não havendo diferença no número de incidência desses genes na coleção. Cerca de 50% dos isolados desta coleção contém os genes *nheB* e *C*, mas nenhum isolado apresenta somente este gene. A ocorrência mais comum de genes foi a combinação *hbl+plc+nhe*, em 34% dos isolados; seguida pela combinação *hbl+plc* (28%).

A coleção de Sete Lagoas (C) mantém a mesma proporcionalidade da coleção de Piracicaba (B) em relação aos genes analisados. A grande maioria dos isolados apresentam os genes *hblA* e *plcR*; cerca de 40% da coleção apresenta a combinação *hbl+plc+nhe* e 35% *hbl+plc* (Figura 1). Poucos isolados foram encontrados contendo somente os genes *plcR* (3%) e *nheB* e *C* (1%).

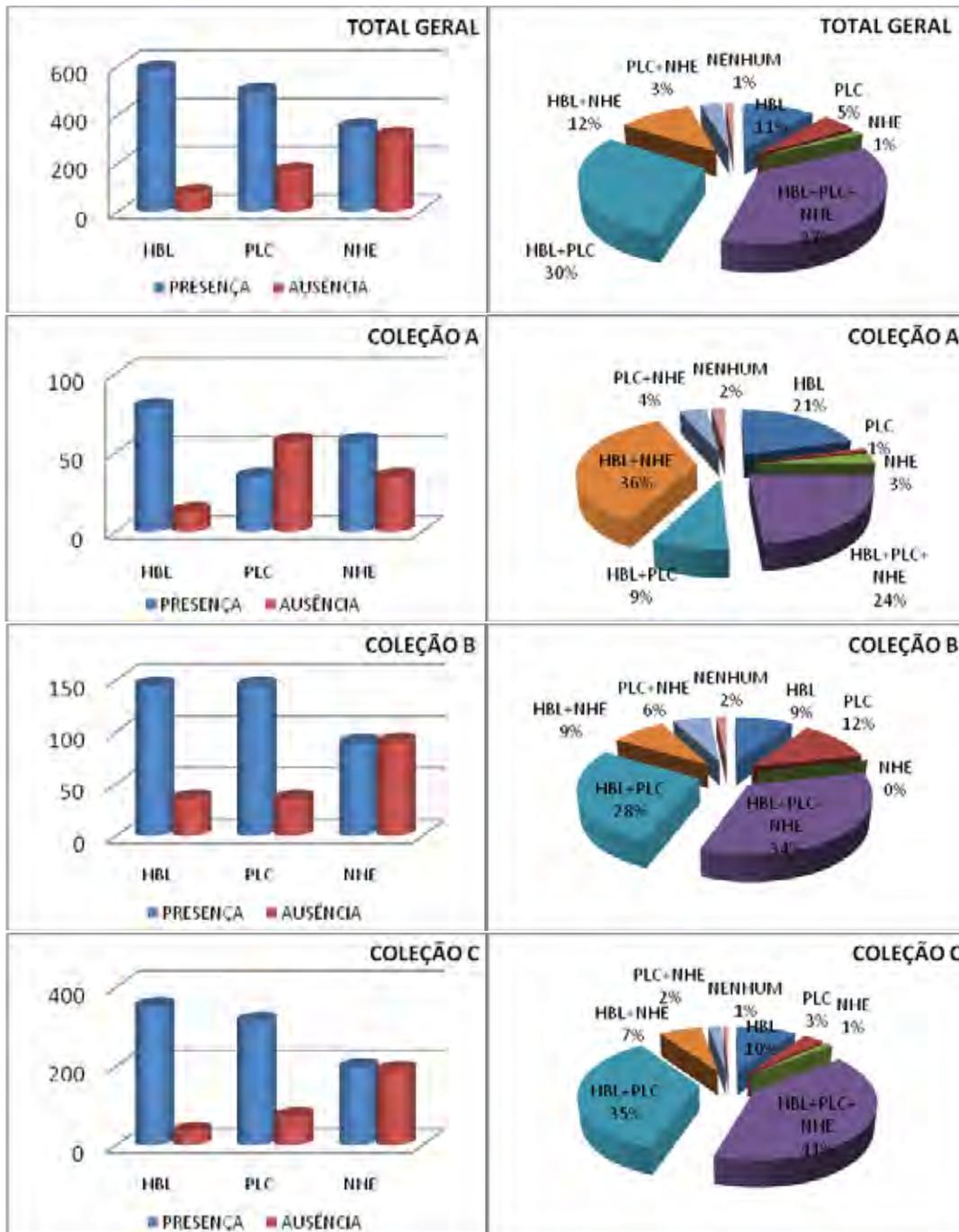


Figura 1. Porcentagem de ocorrência dos genes de enterotoxinas: nas três coleções conjuntamente (total geral) e separadamente (coleções A - Jaboticabal, B – Piracicaba e C - Sete Lagoas).

Na análise da distribuição das enterotoxinas por regiões geográficas (Figura 2), verificou-se, na região Sudeste a maior ocorrência dos genes com a combinação *hbl+plc+nhe* (38%), seguida pela *hbl+plc* (31%). Somente 11% dos isolados apresentaram *hbl+nhe* e 3% *plc+nhe*. Dentro desta região foram baixas as ocorrências individuais dos genes, sendo maior a porcentagem do gene *hblA* (10%); seguida de 5% para o gene *plcR* e 1% para os genes *nheB* e *C*. Apenas dois isolados não continham nenhum dos genes analisados. Portanto, a região Sudeste possui grande abundância de genes das enterotoxinas analisadas, sendo que 90% dos isolados dessa região possuem o gene *hblA*, 78% *plcR* e 55% *nheB* e *C* em seu genoma (Figura 2).

Na região Norte-Nordeste nenhum isolado possui apenas o gene *hblA* e *nheB* e *C* e apenas um isolado apresenta o gene *plcR*. A maior ocorrência conjunta de genes envolveu a combinação *hbl+plc+nhe*, sendo os genes *nheB* e *C* foram os mais abundantes nesta região (Figura 2).

Como verificado nas três regiões, Sul apresentou a maior frequência conjunta de genes na combinação *hbl+plc+nhe*, com 32% dos isolados. Nenhum isolado dessa região apresentou apenas o gene *plcR* e 21% apresentou o gene *hblA*, sendo que as maiores frequências de ocorrência conjunta dos genes se deram para as combinações dos genes *hblA* e *nheBC* (Figura 2).

Diferentemente das outras regiões, a região Centro-Oeste evidenciou a maior frequência para a combinação *hbl+plc* (42%), onde nenhum isolado apresentou apenas os genes *nheB* e *C*. Somente um isolado apresentou *hbl+nhe* e dois isolados a combinação *plc+nhe*. Igual proporção foi verificada para a ocorrência dos genes *hblA* e *plcR* nessa região.

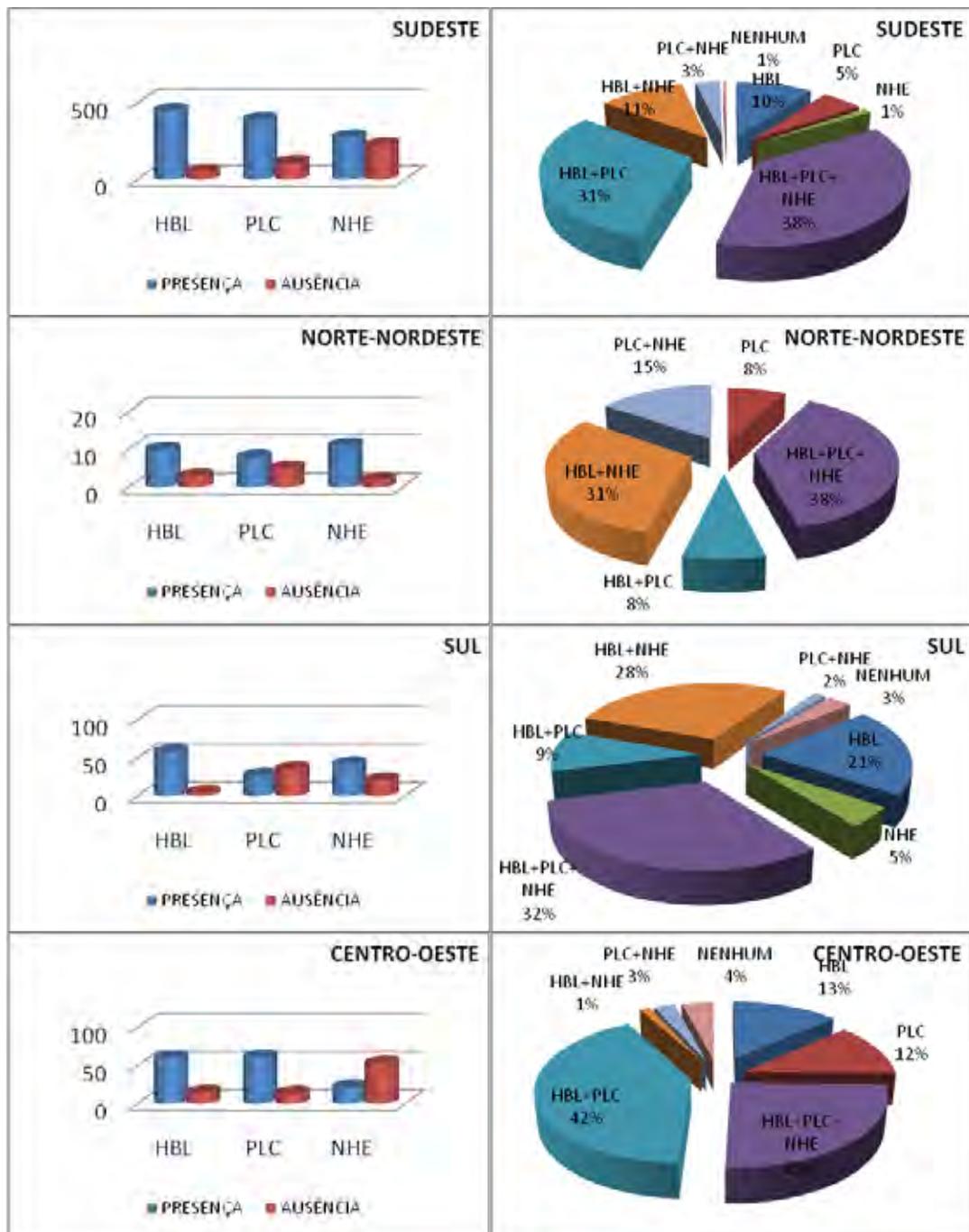


Figura 2. Porcentagem de ocorrência dos genes de enterotoxinas nas diferentes regiões brasileiras.

Análise da estrutura genética entre populações de diferentes coleções e regiões geográficas

A análise de estrutura genética permitiu a caracterização haplotípica dos isolados de *B. thuringiensis* por coleção e por região de origem. Nas tabelas 2 e 6 estão listados os diferentes haplótipos, obtidos após a definição alélica (amplificação + restrição) dos loci *hblA*, *plcR* e *nheB* e *C* determinada por PCR-RFLP, junto com a amplificação do loco *cry1*.

Verificou-se um agrupamento dos isolados em 78 haplótipos na análise por coleções e 76 haplótipos na análise por regiões. Isto porque isolados de outros países ou sem definição de região de origem foram excluídos da análise por região brasileira.

A distribuição dos isolados de *B. thuringiensis*, provenientes de diferentes coleções e regiões, nos seus respectivos haplótipos foi calculada, bem como a frequência com que cada haplótipo aparece por coleção e por região (Tabelas 3 e 7).

Estrutura genética entre coleções de isolados

Na análise de estrutura genética por coleções de isolados de *B. thuringiensis*, verificou-se que para a coleção de Jaboticabal (A) foram definidos 31 haplótipos em 92 isolados, onde 16 haplótipos são exclusivos dela (5, 14, 15, 16,17, 18, 19, 20, 23, 24, 25, 26, 27, 29, 30 e 31). Cerca de 15% dos isolados estão agrupados nos haplótipos 3 e 4, e 12% no haplótipo 12, que representam as maiores frequências nas três coleções.

A coleção de Piracicaba (B) apresentou 36 haplótipos em 181 isolados e 13 haplótipos únicos desta coleção, o que representou uma menor variação no número de haplótipos, ou seja, maior homogeneidade, em relação à coleção de Jaboticabal. As maiores frequências dos isolados da coleção B foram encontradas para os haplótipos 4 (14,4%), 9 e 10 (12,2%).

Tabela 2. Caracterização e distribuição haplotípica nas coleções de isolados de *B. thuringiensis*, de acordo com a composição alélica dos genes *hbIA*, *plcR* e *nheBC*, determinada por PCR-RFLP; e conteúdo de gene *cry1*.

LOCI	<i>hbIA</i>			<i>plcR</i>			<i>nheBC</i>			<i>cry1</i>	COLEÇÃO ²		
	Ap	MbolI	XbaI	Ap	AluI	HaeIII	Ap	DraI	TaqI	Ap			
Polimorfismo de Ap ¹ . ou restrição	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	A	B	C
Alelo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	A	B	C
Haplótipos (n ^o)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	A	B	C
1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	8	5
2	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	6	13	24
3	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	14	5	0
4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	14	26	32
5	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	0	2
6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	4	14	80
7	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	4	7	11
8	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	3	4	2
9	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	22	85
10	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	4	22	31
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	1	0
12	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	11	3	1
13	1	1	1	0	0	0	1	1	2	0	2	2	3
14	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	2	0	0
15	1	2	1	0	0	0	1	1	1	1	3	0	0
16	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
17	0	0	0	0	0	0	1	1	2	0	1	0	0
18	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	2	0	0
19	1	4	1	0	0	0	1	1	1	1	2	0	0
20	1	3	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0
21	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0
22	1	1	1	0	0	0	1	1	2	1	2	0	1
23	1	1	3	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0
24	1	2	1	0	0	0	1	1	2	1	1	0	0
25	1	5	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0
26	1	5	1	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0
27	1	2	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0
28	1	5	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1
29	1	2	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0
30	0	0	0	1	1	3	1	1	2	0	1	0	0
31	1	5	3	1	1	2	0	0	0	0	1	0	0
32	1	1	1	1	3	3	1	1	1	0	0	5	0
33	1	1	1	1	1	3	1	1	1	0	0	4	0
34	1	1	1	1	1	1	1	1	2	0	0	3	6
35	0	0	0	1	1	2	0	0	0	0	0	5	0
36	0	0	0	1	3	3	1	1	1	0	0	1	0
37	1	1	1	1	1	4	1	1	3	1	0	2	0
38	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	5	4
39	1	1	1	0	0	0	1	1	3	0	0	1	8
40	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0
41	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	8	7
42	1	1	1	1	1	2	0	0	0	0	0	2	0

LOCI	<i>hblA</i>			<i>plcR</i>			<i>nheBC</i>			<i>cry1</i>	COLEÇÃO ²		
	Ap	<i>MbolI</i>	<i>XbaI</i>	Ap	<i>AluI</i>	<i>HaeIII</i>	Ap	<i>DraI</i>	<i>TaqI</i>	Ap			
Polimorfismo de Ap ¹ . ou restrição	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	A	B	C
Alelo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	A	B	C
Haplótipos (n ^o)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	A	B	C
43	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	0	3	0
44	0	0	0	1	2	1	1	1	1	0	0	1	0
45	1	1	3	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
46	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	4
47	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	0	2	4
48	1	1	1	1	1	2	1	1	3	0	0	1	0
49	1	1	1	1	1	1	1	1	3	0	0	1	19
50	1	1	1	1	1	4	0	0	0	0	0	1	0
51	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	3
52	1	1	1	0	0	0	1	1	3	1	0	1	1
53	0	0	0	1	1	2	0	0	0	1	0	1	0
54	1	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3
55	1	5	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
56	1	1	2	1	1	1	0	0	0	0	0	0	3
57	0	0	1	1	1	1	1	1	3	0	0	0	1
58	1	5	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7
59	1	1	1	1	3	4	1	1	3	0	0	0	1
60	1	1	3	1	1	1	1	1	1	0	0	0	2
61	0	0	0	1	1	1	1	1	3	0	0	0	1
62	1	5	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	5
63	1	5	1	1	1	1	1	1	3	0	0	0	2
64	1	1	1	1	3	4	1	1	1	0	0	0	1
65	1	1	1	1	3	1	1	1	1	0	0	0	1
66	1	1	1	1	3	1	1	1	2	0	0	0	1
67	1	5	1	1	1	1	1	1	2	0	0	0	1
68	1	1	3	1	3	3	1	1	3	0	0	0	1
69	0	0	0	0	0	0	1	1	3	0	0	0	1
70	1	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
71	1	5	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	2
72	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
73	1	5	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	2
74	1	1	2	1	1	1	1	1	3	1	0	0	1
75	1	1	3	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1
76	1	3	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1
77	1	5	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
78	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1

¹Amplificação. ²A: Jaboticabal; B: Piracicaba; C: Sete Lagoas

As maiores freqüências haplotípicas das coleções foram encontradas na de Sete Lagoas (C) para os haplótipos 6 e 9 (21,2% e 22,5%, respectivamente). Esta coleção definiu 47 haplótipos em 377 isolados analisados e 24 haplótipos foram considerados exclusivos dela. No entanto, apesar de mais numerosa, a coleção de Sete Lagoas é a que apresentou a menor variabilidade haplotípica entre as três analisadas (24/377); em seguida vieram as coleções de Piracicaba (13/181) e de Jaboticabal, esta com maior variabilidade haplotípica (16/92). As maiores freqüências haplotípicas comuns entre as três coleções ocorreram para os haplótipos 2, 4, 6 e 10 (Tabela 3).

Tabela 3. Freqüência e distribuição de haplótipos nos grupos de *B. thuringiensis* nas populações oriundas das diferentes coleções.

Coleção	A		B		C	
	Haplótipos (n ^o)	Freqüência	Distribuição	Freqüência	Distribuição	Freqüência
1	0.0109	1	0.0442	8	0.0133	5
2	0.0652	6	0.0718	13	0.0637	24
3	0.152	14	0.0276	5	0	0
4	0.152	14	0.144	26	0.0849	32
5	0.0109	1	0	0	0.00531	2
6	0.0435	4	0.0773	14	0.212	80
7	0.0435	4	0.0387	7	0.0292	11
8	0.0326	3	0.0221	4	0.00531	2
9	0.0109	1	0.122	22	0.225	85
10	0.0435	4	0.122	22	0.0822	31
11	0.0217	2	0.00552	1	0	0
12	0.12	11	0.0166	3	0.00265	1
13	0.0217	2	0.011	2	0.00796	3
14	0.0217	2	0	0	0	0
15	0.0326	3	0	0	0	0
16	0.0109	1	0	0	0	0
17	0.0109	1	0	0	0	0
18	0.0217	2	0	0	0	0
19	0.0217	2	0	0	0	0
20	0.0109	1	0	0	0	0
21	0.0109	1	0.00552	1	0	0
22	0.0217	2	0	0	0.00265	1
23	0.0109	1	0	0	0	0
24	0.0109	1	0	0	0	0
25	0.0109	1	0	0	0	0
26	0.0217	2	0	0	0	0
27	0.0109	1	0	0	0	0
28	0.0109	1	0	0	0.00265	1
29	0.0109	1	0	0	0	0
30	0.0109	1	0	0	0	0

Coleção	A		B		C		
	Haplótipos (n ^o)	Frequência	Distribuição	Frequência	Distribuição	Frequência	Distribuição
31		0.0109		1	0		0
32		0		0	0.0276		5
33		0		0	0.0221		4
34		0		0	0.0166		3
35		0		0	0.0276		5
36		0		0	0.00552		1
37		0		0	0.011		2
38		0		0	0.0276		5
39		0		0	0.00552		1
40		0		0	0.00552		1
41		0		0	0.0442		8
42		0		0	0.011		2
43		0		0	0.0166		3
44		0		0	0.00552		1
45		0		0	0.00552		1
46		0		0	0.00552		1
47		0		0	0.011		2
48		0		0	0.00552		1
49		0		0	0.00552		1
50		0		0	0.00552		1
51		0		0	0.011		2
52		0		0	0.00552		1
53		0		0	0.00552		1
54		0		0	0.00552		1
55		0		0	0		0
56		0		0	0		0
57		0		0	0		0
58		0		0	0		0
59		0		0	0		0
60		0		0	0		0
61		0		0	0		0
62		0		0	0		0
63		0		0	0		0
64		0		0	0		0
65		0		0	0		0
66		0		0	0		0
67		0		0	0		0
68		0		0	0		0
69		0		0	0		0
70		0		0	0		0
71		0		0	0		0
72		0		0	0		0
73		0		0	0		0
74		0		0	0		0
75		0		0	0		0
76		0		0	0		0
77		0		0	0		0
78		0		0	0		0

A: Jaboticabal; B: Piracicaba; C: Sete Lagoas

Comparações duas a duas entre populações de *B. thuringiensis* das três coleções foram efetuadas utilizando-se estimativas estatísticas (valores FSTs), equivalentes ao F_{ST} de WRIGT (1951). Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 4 onde os valores de FSTs foram significativamente maiores que zero, indicando a diferenciação entre populações de *B. thuringiensis*, principalmente entre as coleções A (Jaboticabal) e C (Sete Lagoas). Essas duas populações foram significativamente diferentes entre si, o que não ocorreu entre as populações de isolados da Coleção B (Piracicaba) e da C (Sete Lagoas), considerando os valores de FSTs, indicando mesma origem geográfica.

Variações na composição alélica das populações podem ser observadas na Tabela 5, onde a maior delas foi verificada em populações de isolados da Coleção A, com seis variações no alelo 2, referente ao sítio de restrição da enzima *MbolI*, para o loco *hblA*. Para este mesmo loco, não houve variação na população da Coleção B, sendo observadas quatro na C. Nos alelos 3, 5, 6 e 9, referentes aos sítios das enzimas *XbaI*, *AluI*, *HaeIII* e *TaqI*, também foram encontradas variações alélicas. Entre as coleções, a maior média de variância foi no alelo 6, referente ao loco *plcR* para a enzima *HaeIII*.

Tabela 4. Valores de FSTs de comparações duas a duas entre populações de *B. thuringiensis* obtidas das diferentes coleções.

Populações	Coleção A Jaboticabal	Coleção B Piracicaba	Coleção C Sete Lagoas
Coleção A	0,00000		
Coleção B	0.12747*	0,00000	
Coleção C	0.19507*	0.02526	0,00000

Valores de FSTs de comparações duas a duas foram calculados usando o programa ARLEQUIN ver 3.000 (Excoffier et al., 2004). Asterisco indica significância dos valores de FSTs a pelo menos $P < 0.05$ (*), o que significa valores FSTs maiores ou iguais aos valores observados quando haplótipos moleculares foram permutados entre populações (1000 permutações foram efetuadas).

Tabela 5. Variância na composição alélica entre as populações de *B. thuringiensis* de diferentes coleções.

Loco	Coleção A	Coleção B	Coleção C	Média	Variância (n ^o)
<i>hblA</i>	1 (Ap)	2	2	2.000	2
	2 (<i>Mbol</i>)	6	2	4.000	6
	3 (<i>Xbal</i>)	3	3	3.333	4
<i>plcR</i>	4 (Ap)	2	2	2.000	2
	5 (<i>Alu</i>)	2	4	3.000	4
	6 (<i>Hae</i> III)	4	5	4.333	5
<i>nheBC</i>	7 (Ap)	2	2	2.000	2
	8 (<i>Dra</i> I)	2	2	2.000	2
	9 (<i>Taq</i> I)	3	4	3.667	4
<i>cry1</i>	10 (Ap)	2	2	2.000	2

A: Jaboticabal; B: Piracicaba; C: Sete Lagoas

Estrutura genética entre isolados de diferentes regiões geográficas

Na análise de estrutura genética dos isolados provenientes de diferentes regiões geográficas verificou-se que, para a região Centro-Oeste, as maiores frequências haplotípicas encontram-se nos haplótipos 4, 7 e 9, com 11,3%, 21,1% e 26,8%, respectivamente. Para o haplótipo 9 é a maior frequência encontrada dentre as regiões analisadas. Esta região definiu 18 haplótipos em 71 isolados, sendo eles comuns entre os isolados das demais regiões, principalmente da região Sudeste (Tabela 6).

A região Norte-Nordeste definiu 8 haplótipos em 13 isolados analisados. Cerca de 23% da população desta região encontra-se no haplótipo 7, comumente encontrado entre as regiões; e no haplótipo 19, evidenciando uma alta frequência em relação às demais regiões. Somente o haplótipo 22 é exclusivo do Norte-Nordeste, representado por uma frequência de 7,8% (Tabela 7).

Tabela 6. Caracterização e distribuição haplotípica nas populações de isolados de *B. thuringiensis*, provenientes de diferentes regiões, de acordo com a composição alélica dos genes *hblA*, *plcR* e *nheBC*, determinada por PCR-RFLP; e conteúdo de gene *cry1*.

LOCI	<i>hblA</i>			<i>plcR</i>			<i>nheBC</i>			<i>cry1</i>	REGIÃO ²			
	Ap	MbolI	XbaI	Ap	AluI	HaeIII	Ap	DraI	TaqI	Ap				
Polimorfismo de Ap ¹ . ou restrição	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	CO	NN	SL	SD
Alelo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	CO	NN	SL	SD
Haplótipos (n ^o)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	CO	NN	SL	SD
1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	2	0	0	12
2	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	4	0	3	36
3	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	7
4	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	8	1	1	97
5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	2	0	5	90
6	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1
7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	15	3	11	40
8	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	10	8
9	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	19	0	4	33
10	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	9	5
11	1	1	1	1	1	1	1	1	2	0	1	2	0	6
12	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	6	0	0	8
13	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	7
14	1	5	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	4
15	1	5	1	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	3
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	2
17	1	1	3	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	3
18	1	1	1	1	1	1	1	1	3	0	1	0	0	18
19	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	3	1	18
20	0	0	0	1	1	2	0	0	0	0	0	1	0	4
21	1	1	1	0	0	0	1	1	3	0	0	1	0	8
22	0	0	0	1	3	3	1	1	1	0	0	1	0	0
23	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	0	0	1	2
24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	1
25	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	2	0
26	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0
27	0	0	0	0	0	0	1	1	2	0	0	0	1	0
28	1	1	1	0	0	0	1	1	2	0	0	0	1	6
29	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1
30	1	1	1	0	0	0	1	1	2	1	0	0	1	1
31	1	1	3	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0
32	1	2	1	0	0	0	1	1	2	1	0	0	1	0
33	1	2	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	2
34	1	5	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0
35	1	5	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	0
36	1	2	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0
37	1	5	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1
38	1	4	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	2
39	1	3	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1
40	1	2	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1

LOCI	<i>hblA</i>			<i>plcR</i>			<i>nheBC</i>			<i>cry1</i>	REGIÃO ²			
	Polimorfismo de Ap ¹ . ou restrição	Ap	MbolI	XbaI	Ap	AluI	HaeIII	Ap	DraI	TaqI				
Alelo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	CO	NN	SI	SD
Haplótipos (n ⁰)														
41	1	1	1	1	3	3	1	1	1	0	0	0	0	4
42	1	1	1	1	1	3	1	1	1	0	0	0	0	4
43	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
44	1	1	1	1	1	2	0	0	0	0	0	0	0	2
45	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	0	0	0	3
46	0	0	0	1	2	1	1	1	1	0	0	0	0	1
47	1	1	3	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1
48	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	5
49	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	0	0	0	6
50	1	1	1	1	1	2	1	1	3	0	0	0	0	1
51	1	1	1	1	1	4	1	1	3	1	0	0	0	1
52	1	1	1	1	1	4	0	0	0	0	0	0	0	1
53	1	1	1	0	0	0	1	1	3	1	0	0	0	2
54	0	0	0	1	1	2	0	0	0	1	0	0	0	1
55	1	1	2	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	3
56	1	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
57	1	5	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	2
58	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1
59	1	5	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1
60	1	5	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	2
61	1	1	2	1	1	1	1	1	3	1	0	0	0	1
62	1	1	3	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1
63	1	3	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1
64	0	0	1	1	1	1	1	1	3	0	0	0	0	1
65	1	5	1	1	1	1	1	1	3	0	0	0	0	2
66	1	5	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
67	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1
68	0	0	0	1	1	1	1	1	3	0	0	0	0	1
69	0	0	0	0	0	0	1	1	3	0	0	0	0	1
70	1	1	3	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	2
71	1	1	1	1	3	4	1	1	3	0	0	0	0	1
72	1	1	1	1	3	1	1	1	2	0	0	0	0	1
73	1	1	3	1	3	3	1	1	3	0	0	0	0	1
74	1	5	1	1	1	1	1	1	2	0	0	0	0	1
75	1	1	1	1	3	4	1	1	1	0	0	0	0	1
76	1	1	1	1	3	1	1	1	1	0	0	0	0	1

⁽¹⁾Amplificação. ⁽²⁾CO: Centro-Oeste; NN: Norte-Nordeste; SL: Sul; SD:Sudeste

Na região Sul encontram-se 24 haplótipos definidos para 63 isolados que compõem esta população. Dos 24 haplótipos, 8 estão presentes somente nesta região, indicando a alta variabilidade haplotípica desses isolados, quando comparados às demais regiões. A região Sul caracteriza-se principalmente pelos haplótipos 7, 8 e 10, com freqüências de 17,5%, 15,9% e 14,3%, respectivamente (Tabela 6).

Na região Sudeste encontrou-se 67 haplótipos em 489 isolados. Dos 67 haplótipos desta região, 28 foram compartilhados com outras regiões, indicando que, apesar de numerosa, há uma baixa freqüência para haplótipos característicos da região Sudeste (39/489). As maiores freqüências encontradas na região Sudeste foram obtidas para os haplótipos 4 e 5 (19,8% e 18,4%, respectivamente); muitos dos haplótipos definidos para o Sudeste estão representados por apenas um isolado.

Tabela 7. Freqüência e distribuição de haplótipos nos grupos de *B. thuringiensis* nas populações oriundas das diferentes regiões.

REGIÃO Haplótipos (n ^o)	CO		NN		SL		SD	
	F	D	F	D	F	D	F	D
1	0.0282	2	0	0	0	0	0.0245	12
2	0.0563	4	0	0	0.0476	3	0.0736	36
3	0.0141	1	0	0	0.0159	1	0.0143	7
4	0.113	8	0.0769	1	0.0159	1	0.198	97
5	0.0282	2	0	0	0.0794	5	0.184	90
6	0.0141	1	0	0	0	0	0.00204	1
7	0.211	15	0.231	3	0.175	11	0.0818	40
8	0.0141	1	0	0	0.159	10	0.0164	8
9	0.268	19	0	0	0.0635	4	0.0675	33
10	0.0141	1	0	0	0.143	9	0.0102	5
11	0.0141	1	0.154	2	0	0	0.0123	6
12	0.0845	6	0	0	0	0	0.0164	8
13	0.0141	1	0.0769	1	0	0	0.0143	7
14	0.0141	1	0	0	0	0	0.00818	4
15	0.0423	3	0	0	0	0	0.00613	3
16	0.0423	3	0	0	0	0	0.00409	2
17	0.0141	1	0	0	0	0	0.00613	3
18	0.0141	1	0	0	0	0	0.0368	18
19	0	0	0.231	3	0.0159	1	0.0368	18
20	0	0	0.0769	1	0	0	0.00818	4
21	0	0	0.0769	1	0	0	0.0164	8
22	0	0	0.0769	1	0	0	0	0
23	0	0	0	0	0.0159	1	0.00409	2
24	0	0	0	0	0.0317	2	0.00204	1
25	0	0	0	0	0.0317	2	0	0
26	0	0	0	0	0.0159	1	0	0

REGIÃO Haplótipos (n ^o)	CO		NN		SL		SD	
	F	D	F	D	F	D	F	D
27	0	0	0	0	0.0159	1	0	0
28	0	0	0	0	0.0159	1	0.0123	6
29	0	0	0	0	0.0159	1	0.00204	1
30	0	0	0	0	0.0159	1	0.00204	1
31	0	0	0	0	0.0159	1	0	0
32	0	0	0	0	0.0159	1	0	0
33	0	0	0	0	0.0159	1	0.00409	2
34	0	0	0	0	0.0159	1	0	0
35	0	0	0	0	0.0317	2	0	0
36	0	0	0	0	0.0159	1	0	0
37	0	0	0	0	0.0159	1	0.00204	1
38	0	0	0	0	0	0	0.00409	2
39	0	0	0	0	0	0	0.00204	1
40	0	0	0	0	0	0	0.00204	1
41	0	0	0	0	0	0	0.00818	4
42	0	0	0	0	0	0	0.00818	4
43	0	0	0	0	0	0	0.00204	1
44	0	0	0	0	0	0	0.00409	2
45	0	0	0	0	0	0	0.00613	3
46	0	0	0	0	0	0	0.00204	1
47	0	0	0	0	0	0	0.00204	1
48	0	0	0	0	0	0	0.0102	5
49	0	0	0	0	0	0	0.0123	6
50	0	0	0	0	0	0	0.00204	1
51	0	0	0	0	0	0	0.00204	1
52	0	0	0	0	0	0	0.00204	1
53	0	0	0	0	0	0	0.00409	2
54	0	0	0	0	0	0	0.00204	1
55	0	0	0	0	0	0	0.00613	3
56	0	0	0	0	0	0	0.00204	1
57	0	0	0	0	0	0	0.00204	2
58	0	0	0	0	0	0	0.00204	1
59	0	0	0	0	0	0	0.0245	1
60	0	0	0	0	0	0	0.0736	2
61	0	0	0	0	0	0	0.0143	1
62	0	0	0	0	0	0	0.198	1
63	0	0	0	0	0	0	0.184	1
64	0	0	0	0	0	0	0.00204	1
65	0	0	0	0	0	0	0.0818	2
66	0	0	0	0	0	0	0.0164	1
67	0	0	0	0	0	0	0.0675	1
68	0	0	0	0	0	0	0.0102	1
69	0	0	0	0	0	0	0.0123	1
70	0	0	0	0	0	0	0.0164	2
71	0	0	0	0	0	0	0.0143	1
72	0	0	0	0	0	0	0.00818	1
73	0	0	0	0	0	0	0.00613	1
74	0	0	0	0	0	0	0.00409	1
75	0	0	0	0	0	0	0.00613	1
76	0	0	0	0	0	0	0.0368	1

CO: Centro-Oeste; NN: Norte-Nordeste; SL: Sul; SD: Sudeste

As comparações, duas a duas, também foram efetuadas entre populações de *B. thuringiensis* das quatro regiões geográficas utilizando-se estimativas estatísticas (valores FSTs) equivalentes ao F_{ST} de WRIGT (1951). Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 8, onde os valores de FSTs foram significativamente maiores que zero, indicando a diferenciação entre populações de *B. thuringiensis*, principalmente entre as populações das regiões Norte-Nordeste e Centro-Oeste e das regiões Sul e Centro-Oeste. Essas duas populações foram significativamente diferentes entre si, de acordo os valores FSTs.

Nas populações de isolados de *B. thuringiensis* da região Sudeste e da região Norte-Nordeste não houve indicação de diferenciação significativa, quando se consideraram os valores de F_{STs} , o que pode indicar uma possível troca de informação genética entre as populações dessas regiões (fluxo gênico).

Valores significativos de diferenciação entre populações também foram encontrados entre as populações das regiões Sudeste e Sul, Sudeste e Centro-Oeste e Sul e Norte-Nordeste. A população da região Centro-Oeste foi a que apresentou os dois maiores valores de diferenciação genética, em relação as regiões Norte-Nordeste e Sul, de acordo com os valores FSTs (Tabela 8).

Tabela 8. Valores de FSTs de comparações duas a duas entre populações de *B. thuringiensis* obtidas das diferentes regiões geográficas.

Regiões	Centro-oeste	Norte-nordeste	Sul	Sudeste
Centro-Oeste	0.00000			
Norte-Nordeste	0.17267*	0.00000		
Sul	0.17074*	0.08219*	0.00000	
Sudeste	0.06508*	0.04748	0.14442*	0.00000

Valores de FSTs de comparações duas a duas foram calculados usando o programa ARLEQUIN ver 3.000 (Excoffier et al., 2004). Asterisco indica significância dos valores de FSTs a pelo menos $P < 0.05$ (*), o que significou valores FSTs maiores ou iguais aos valores observados quando haplótipos moleculares foram permutados entre populações (1000 permutações foram efetuadas).

As variações na composição alélica das populações de *B. thuringiensis* das diferentes regiões foram calculadas e estão representadas na Tabela 9. A maior média de variação alélica foi verificada para o loco referente ao sítio de restrição da enzima *MbolI*, onde a maior variação alélica foi verificada em populações de isolados da região Sudeste, totalizando seis variações. Para este mesmo loco, não houve variação alélica na população da região Norte-Nordeste; foram verificadas cinco variações na população da região Sul e três na região Centro-Oeste.

O loco referente ao sítio de restrição da enzima *TaqI* foi variável para todas as regiões geográficas analisadas, com quatro variações alélicas nas regiões Centro-Oeste, Norte-Nordeste e Sudeste; e três variações na região Sul. Variações na composição alélica também foram encontradas nos loci 3, 5 e 6, referentes aos sítios das enzimas *XbaI*, *AluI* e *HaeIII*. Entre as regiões, a maior média de variância está no alelo 6, referente ao loco *plcR* para a enzima *HaeIII* (Tabela 9).

Tabela 9. Variações na Composição alélica das populações de isolados de *B. thuringiensis* provenientes de diferentes regiões geográficas.

Loco	Centro-Oeste	Norte-Nordeste	Sul	Sudeste	Média	Varição (n ^o)
1 (Ap)	2	2	2	2	2.000	2
<i>hblA</i> 2 (<i>MbolI</i>)	3	2	5	6	4.000	6
3 (<i>XbaI</i>)	3	2	3	4	3.000	4
4 (Ap)	2	2	2	2	2.000	2
<i>plcR</i> 5 (<i>AluI</i>)	2	3	2	4	2.750	4
6 (<i>HaeIII</i>)	2	4	2	5	3.250	5
7 (Ap)	2	2	2	2	2.000	2
<i>nheBC</i> 8 (<i>DraI</i>)	2	2	2	2	2.000	2
9 (<i>TaqI</i>)	4	4	3	4	3.750	4
<i>cry1</i> 10 (Ap)	2	2	2	2	2.000	2

Análise de agrupamento (Multivariada)

A análise multivariada realizada para as populações pertencentes às três diferentes coleções e regiões brasileiras evidenciou que isolados brasileiros apresentam grande semelhança genética, quando se avalia o polimorfismo de genes de enterotoxinas e conteúdo de gene *cry1*. Dos 650 isolados analisados, apenas três grupos foram formados. Isto pode ser visualizado quando se observa a formação de grandes grupos de isolados, dispostos ao longo do dendrograma gerado pela análise que contempla todos os isolados utilizados (Figura 3).

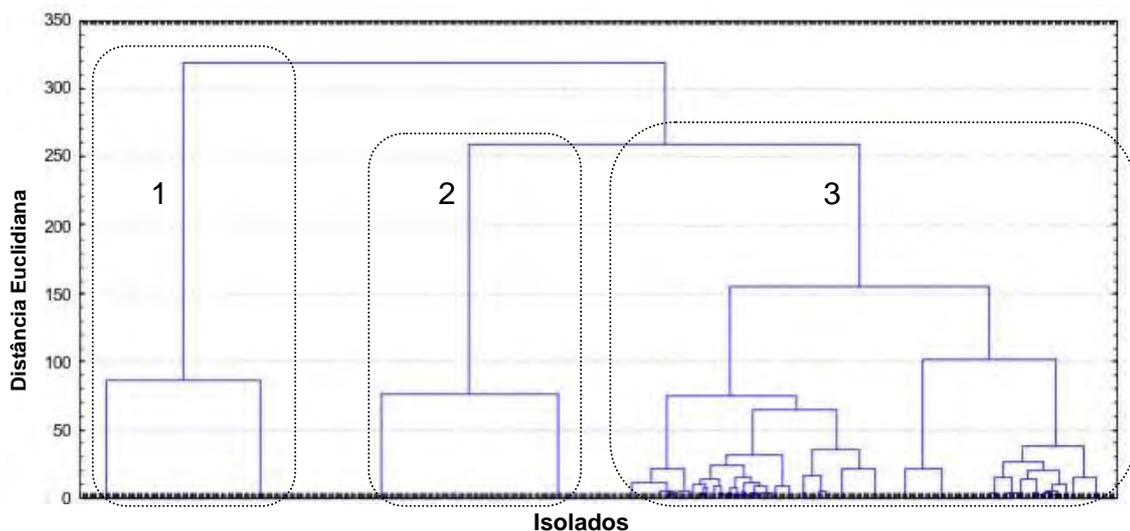


Figura 3. Dendrograma referente à análise do polimorfismo dos perfis de restrição dos genes *hblA*, *plcR* e *nheBC*, nas populações pertencentes às três coleções.

Esta análise mostrou a similaridade entre populações de isolados de *B. thuringiensis* quanto à coleção e/ou região de origem, já que isolados das diferentes coleções/regiões encontram-se distribuídos ao longo de todo o dendrograma. No entanto, pode ser observado na Figura 3 a formação de três grandes grupos. Os grupos 1 e 2 foram formados, principalmente, por isolados da coleção C e região Sudeste, que apresentaram alta similaridade entre isolados dentro de cada grupo, mas se

destacaram dos demais, que formaram o grupo 3, com menor homogeneidade. Essas observações foram feitas com base na distância Euclidiana (eixo Y do dendrograma), e podem ser justificadas pelos baixos valores FSTs da diferenciação genética entre as populações das coleções/regiões brasileiras (Tabelas 4 e 8).

Distribuição das coleções dentro das regiões geográficas

A arquitetura de grupos formados na análise das populações oriundas de diferentes regiões geográficas mostra a diversidade dos isolados dentro de cada região específica e a distribuição das diferentes coleções dentro de cada região.

A formação dos grupos nos dendrogramas gerados por essa análise está de acordo com os haplótipos definidos e a formação dos grupos de isolados segundo o mesmo haplótipo. Portanto, cada grupo, bem como os pequenos subgrupos formados nos dendrogramas, compartilham haplótipos semelhantes, segundo a análise de estrutura genética.

A região sul, composta por isolados da coleção de Jaboticabal (A), com exceção dos isolados E22, E26, E27 e E28, apresentou uma estrutura formada por três grupos (Figura 4). A arquitetura de grupos mostrou uma grande similaridade entre a maioria dos isolados denominados "Br", mas revelou pequenos subgrupos destes isolados. No grupo 1 encontram-se os isolados da coleção de Piracicaba (B): E26, E27 e E28, com exceção do E22. Esses isolados, apesar de apresentarem a mesma região de origem, ficaram localizados em um grupo diferente dos demais, os denominados "Br", que compõem os grupos 2 e 3 do dendrograma.

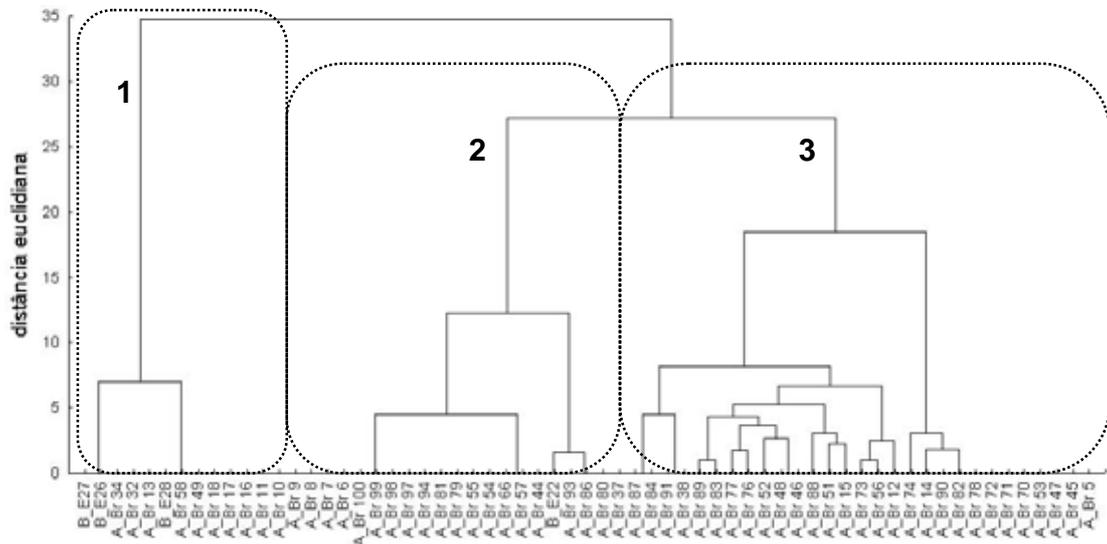


Figura 4. Dendrograma referente à análise de polimorfismo de genes de enterotoxinas e conteúdo do gene *cry1* em isolados da região sul.

Para a região Centro-Oeste também ocorreu a formação de três grupos, onde os isolados da mesma coleção tenderam a formar pequenos grupos (Figura 5). Notou-se que os isolados da coleção C permaneceram agrupados ao longo do dendrograma e que os da coleção B formaram um pequeno grupo, dentro do grupo 1, misturando-se com isolados da coleção A. Observou-se também no grupo 3 que as populações de isolados das coleções A e B possuem uma tendência à formação de um único grupo, separado da coleção C, o que sugeriu que a coleção A e B são mais próximas entre si ou que a coleção C é a que possui maior dissimilaridade em relação às demais coleções.

A região Norte-Nordeste contribuiu com um número pequeno de isolados, pertencentes à coleção B, onde baixos valores de distância Euclidiana puderam ser observados entre os isolados, o que impediu a formação de grupos diferenciados, com esses isolados (Figura 6).

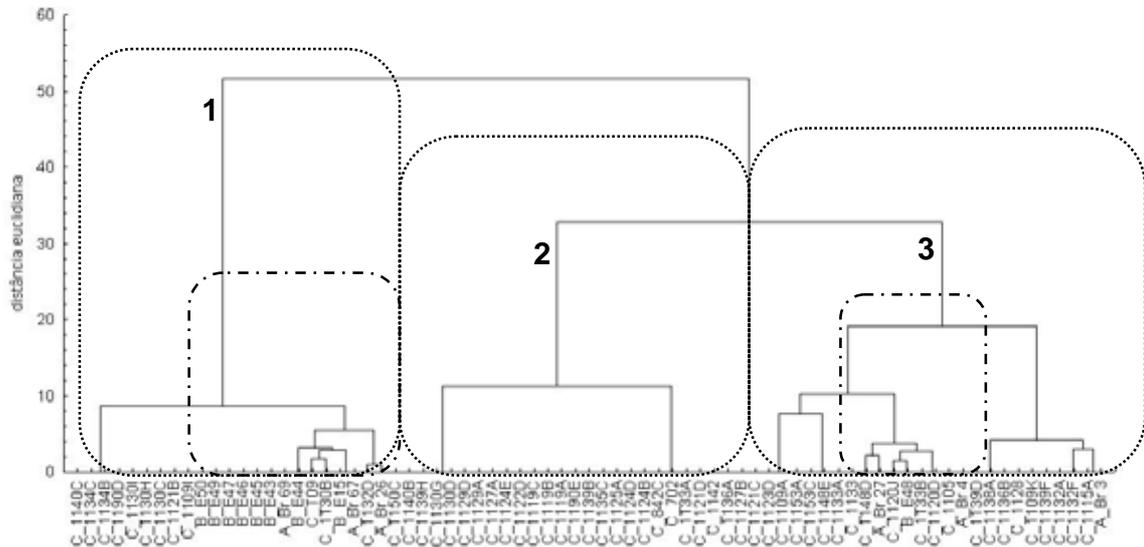


Figura 5. Dendrograma referente à análise de polimorfismo de genes de enterotoxinas e conteúdo do gene *cry1* em isolados da região Centro-Oeste.

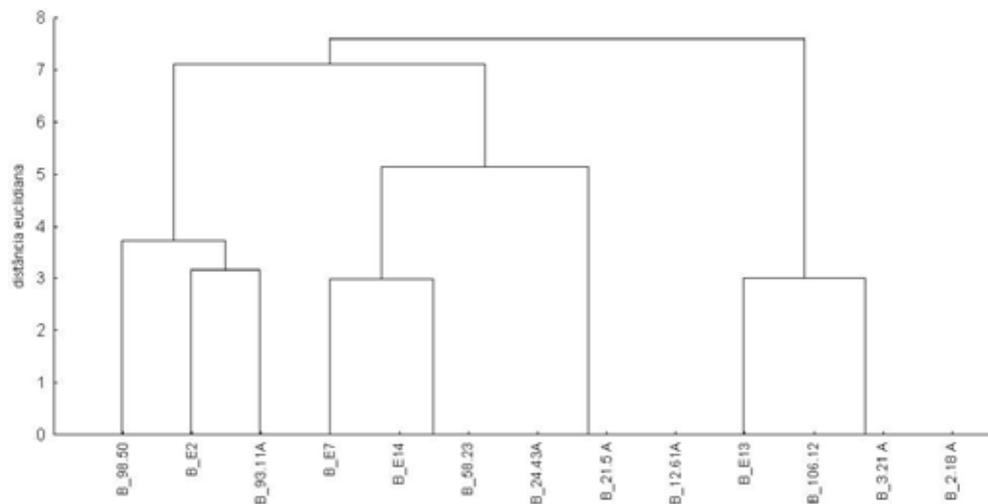


Figura 6. Dendrograma referente à análise de polimorfismo de genes de enterotoxinas e conteúdo do gene *cry1* em isolados da região Norte-Nordeste.

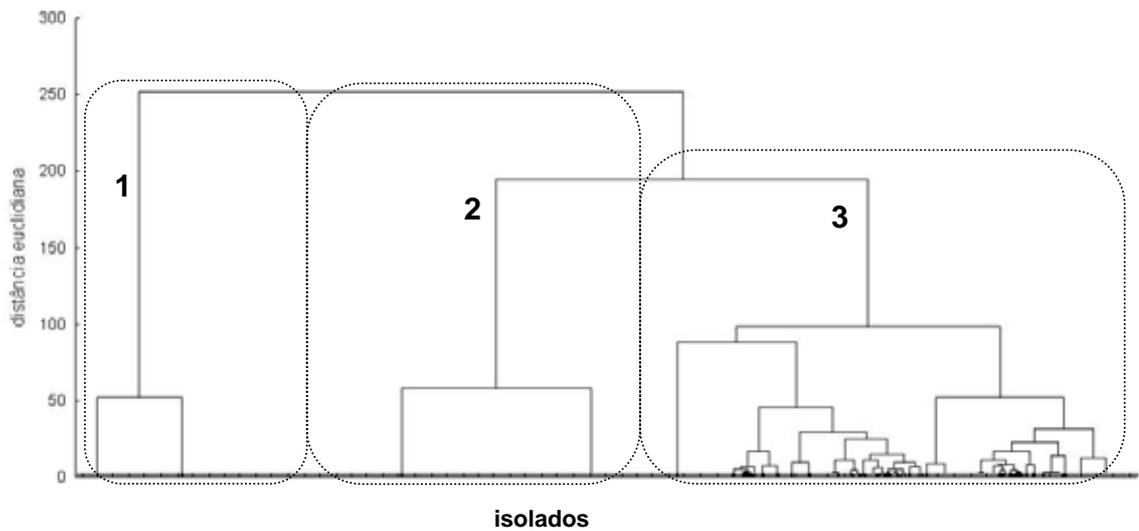


Figura 7. Dendrograma referente à análise de polimorfismo de genes de enterotoxinas e conteúdo do gene *cry1* em isolados da região Sudeste.

A região Sudeste apresentou o maior número de isolados deste estudo e a arquitetura de grupos formada foi bastante complexa, por contar com alta diversidade. Na Figura 7 podem ser observados três grupos distintos, dentre os quais os grupos 1 e 2 contemplam os isolados mais similares entre si e que se distanciaram daqueles do grupo 3, que apresentou menor similaridade, como indicado pelas maiores distâncias euclidianas entre representantes de um mesmo grupo.

Devido ao grande número de isolados da região Sudeste pode-se considerá-la como a que possui uma situação única, em comparação às demais regiões, sendo que para tal, as distâncias euclidianas consideradas para incluir isolados dentro de um mesmo grupo, foram muito superiores às consideradas para as demais regiões. Isto indicou que quanto maior o número de isolados empregados no estudo, maior a chance de se perceber as similaridades e dissimilaridades entre os mesmos, como representado também pelo maior número de haplótipos moleculares encontrados na análise de estrutura genética.

DISCUSSÃO

Caracterização do conteúdo gênico de enterotoxinas

A caracterização das coleções quanto a presença do gene *plcR* e ao conteúdo de genes de enterotoxinas *hblA* e *nheBC* apresentada revelou que, isolados utilizados para testes de atividade inseticida, apresentam genes relacionados à produção de enterotoxinas. O isolado Br38, ocasionou cerca de 50% de mortalidade para *Spodoptera frugiperda* (FATORETTO, 2002); e outros denominados “Br” apresentaram 100% de mortalidade para *P. xylostella*, indicando que a efetividade da bactéria *B. thuringiensis* independe do conjunto de genes *cry* que cada isolado possui (THULER et al., 2007).

Notou-se, contudo, que todos os isolados testados em *P. xylostella* apresentam o gene da enterotoxina hemolítica *hblA* em seu genoma. Somente um apresentou apenas o *hblA*, sendo que os demais apresentam dois ou três dos genes avaliados. Fato semelhante ocorreu para os isolados testados em *S. frugiperda*, onde todos apresentam dois ou três genes enterotóxicos. Nos testes realizados por FATORETTO (2002), o isolado BR38 foi o que provocou a menor mortalidade de larvas de *S. frugiperda* em relação aos demais, e é o único que não apresentou nenhum dos genes de enterotoxinas.

Sabe-se que a mortalidade de insetos ocorre em função da presença de pelo menos um gene *cry* da bactéria *B. thuringiensis*, específico para cada ordem ou mesmo espécie de inseto. No entanto, a expressão de genes codificadores de enterotoxinas nos isolados é relevante, pois a eficácia dos mesmos pode estar relacionada não só à expressão de genes *cry*, mas também à expressão de genes de enterotoxinas. O efeito prolongado de infecção e posterior morte causada pela bactéria é um fator importante a ser considerado, já que a mortalidade pode ser ocasionada mais pela infecção instalada (septicemia) por ação das enterotoxinas do que pela ação imediata da toxina.

FREDERIKSEN et al., (2006) caracterizaram 128 linhagens como sendo de *B. cereus*, isoladas de frutas e vegetais frescos à venda em lojas de varejo na Dinamarca,

indicando que os resíduos de inseticidas baseados em *B. thuringiensis* podem ser encontrados em frutas e em vegetais frescos e que estes são potencialmente enterotoxigênicos. Os autores verificaram que das linhagens previamente classificadas como *B. cereus*, 39% (50/128) foram classificadas como *B. thuringiensis*; 23 das 50 eram da mesma subespécie de *B. thuringiensis* utilizada como bioinseticida comercial; 14 isolados não diferiam de *B. thuringiensis kurstaki* HD1, apresentado nos produtos Dipel, Biobit, e Foray, e nove foram agrupados com *B. thuringiensis aizawai*. A frequência dos genes de enterotoxinas hemolítica BL (HBL) e da enterotoxina não-hemolítica (NHE) era mais elevada entre as linhagens que não diferiam das linhagens comerciais do que entre o outro grupo de *B. thuringiensis* e linhagens consideradas como *B. cereus* isoladas das frutas e dos vegetais. O mesmo foi constatado para uma terceira enterotoxina, CytK.

Desde que todas as linhagens comerciais abriguem genes para todas as três enterotoxinas, HBL, NHE, e CytK há um risco de que os níveis elevados destes organismos possam causar infecção em humanos. É sabido ainda, que a bactéria *B. thuringiensis* não pode ser separada de *B. cereus* por comparação de marcadores genéticos cromossomais, fazendo-se necessário que os produtores agrícolas e as autoridades responsáveis pela segurança alimentar considerem a quantidade de resíduo do inseticida a base de *B. thuringiensis* em produtos, após a colheita. A recomendação é de que os níveis de resíduos de *B. thuringiensis*, que codificam enterotoxinas, estejam entre 10^3 e 10^5 UFC/g, e que não sejam alcançados no dia do consumo (FREDERIKSEN et al., 2006).

Em outro trabalho, amostras fecais de sete homens, trabalhando em casa de vegetação com inseticidas à base de *B. thuringiensis*, foram examinadas e os isolados encontrados foram indistinguíveis das linhagens utilizadas em formulações comerciais. No entanto, nenhum efeito gastrointestinal foi verificado em cinco dos sete trabalhadores, e nenhuma evidência comprovou que os efeitos nos outros trabalhadores estejam relacionados com a presença da bactéria avaliada, isolada de suas fezes (JENSEN et al., 2002).

Sabe-se que a proteína Cry não é tóxica ao homem e suas ações englobam inúmeras vantagens, como especificidade ao inseto-alvo, efeito não poluente ao ambiente, inocuidade a mamíferos e vertebrados e por não serem fitopatogênicas. Contudo, a potencialidade dos bioinseticidas à base de *B. thuringiensis* é aumentada quando se utiliza, além dos cristais, esporos da bactéria nas formulações. Portanto, a aplicação e comercialização de novos produtos sempre passa por cuidados extremos antes da liberação dos mesmos.

Análise da estrutura genética entre populações de diferentes coleções e regiões geográficas

Neste trabalho avaliou-se a estrutura genética de 650 isolados de *B. thuringiensis*, por meio da técnica de PCR-RFLP, acessando o grau de heterogeneidade genética das populações de isolados, entre as coleções e regiões brasileiras, verificando a frequência de distribuição dos mesmos nas diferentes coleções e regiões do Brasil.

A obtenção de 78 haplótipos, definidos para as populações das diferentes coleções (Tabelas 2 e 3), e 76 haplótipos, definidos para as populações de diferentes regiões brasileiras (Tabelas 6 e 7) retratam a baixa variabilidade genética para os loci *hblA*, *plcR*, *nheBC* e *cry1* analisados. Os haplótipos definidos com a análise conjunta dos alelos de amplificação e de restrição, permitiram detectar a diversidade genética variável em função da coleção e da localidade de origem das populações. Resultados contrários foram obtidos por PICCHI et al., (2006), os quais permitiram detectar níveis de diversidade genética variáveis no sistema de restrição-modificação de *Xylella fastidiosa*, em função do hospedeiro e/ou localidade de origem da bactéria, também por PCR-RFLP, utilizando análises de estruturação de grupos genéticos.

As maiores variações ocorrentes, contudo, encontram-se nos alelos 2 e 6, referentes aos sítios de restrição das enzimas *MbolI* e *HaeIII*, nos loci *hblA* e *plcR*, respectivamente. Neste trabalho, o maior polimorfismo gerado foi para o gene *plcR*, um gene regulador, responsável pela transcrição de genes que codificam a atividade

hemolítica, incluindo fosfolipases e hemolisinas características de *B. thuringiensis* e de *B. cereus*. O rompimento do *plcR* em *B. cereus* e em *B. thuringiensis* reduz drasticamente a atividade hemolítica e as propriedades citotóxicas destes organismos, em comparação com *B. anthracis* que não produz estas proteínas, devido a uma mutação no gene regulador *plcR*. Diferentes tipos de mutações são responsáveis por estes fenótipos, sendo que um tipo de mutação em *plcR* foi verificada em linhagens de *B. anthracis* sugerindo que esta é um traço distintivo para a espécie.

Para tanto, o que caracteriza membros do grupo de *B. cereus* não é a presença ou ausência do gene, mas as mudanças na expressão do *plcR*, que ocorre nas linhagens de *B. anthracis* (SLAMTI et al., 2004).

A estrutura populacional do grupo de *B. cereus* foi avaliada por KO ET al. (2004), que observou uma mutação no gene *plcR*, encontrada somente em linhagens de *B. anthracis*. Embora esse gene não seja funcional, sua taxa mutacional em *B. anthracis* foi muito baixa, como nos outros genes cromossomais. Os autores sugerem que a inativação do *plcR*-regulador devido a mutações do *plcR*, deve ter evoluído recentemente, ou seja, após a especiação de *B. anthracis* (MIGNOT et al., 2001).

O presente estudo verificou que as populações de isolados avaliados apresentam diferentes tipos de mutações no loco *plcR*, regulador de fenótipos que caracterizam e diferenciam bactérias do grupo de *B. cereus*, sendo esse o loco mais variável das coleções.

Para ser introduzido no mercado e utilizado, um bioinseticida baseado em *B. thuringiensis* deve ser avaliado para assegurar-se de que seu uso não cause riscos à saúde humana e ao ambiente. Nos Estados Unidos, a agência de proteção ambiental (USEPA) e os estados individuais (geralmente o departamento do estado da agricultura) registram ou licenciam inseticidas para uso comercial. Os testes requeridos para avaliar a toxicidade não devem indicar nenhum efeito adverso significativo nos animais testados e no ambiente, garantindo assim a segurança dos produtos à base de *B. thuringiensis* (VILAS-BÔAS et al., 2007) (maiores detalhes podem ser encontrados em: www.epa.gov/pesticides/biopesticides/regtools/guidelines/index.htm).

Diversos ensaios constataram a eficiência de isolados, das coleções caracterizadas neste estudo, em programas de controle biológico, com perspectivas para novas linhagens eficientes no controle de diferentes espécies de insetos ou ainda, insetos não suscetíveis às linhagens utilizadas até então (THULER et al., 2007; VIANA, 2007; FATORETTO, 2002). A partir da eficiência bioinseticida comprovada, análises de estrutura populacional foram efetuadas neste trabalho, verificando diferenças entre populações de diferentes coleções e regiões.

As populações das coleções B (Piracicaba) e C (Sete Lagoas) foram significativamente diferentes, segundo valores FSTs, da coleção A (Jaboticabal). Diferenças entre coleções podem estar relacionadas à origem dos isolados ou, quando os isolados são da mesma região de origem, ao intervalo de tempo entre as coletas, às condições de isolamento, como diferenças de solo, plantio/cultura, bem como práticas culturais empregadas nesses cultivos (adubação, agrotóxicos etc.). Neste caso, a população da coleção A, apesar de menos numerosa, possui a maior diversidade em relação à origem e uma maior amostragem de isolados por região, sendo eles provenientes das regiões Centro-Oeste, Sul e Sudeste, contendo ainda isolados sem definição de origem. Isto pode ser um fator determinante da diferenciação desta coleção em relação às outras. Na população da coleção B, por exemplo, os isolados provêm de diversas regiões brasileiras e até de outros países, mas a grande maioria é originária da região Sudeste, assim como a população da Coleção C.

Diferenças significativas também foram verificadas entre populações provenientes das diferentes regiões brasileiras. Foram estabelecidos 76 diferentes haplótipos entre as regiões, mostrando a diversidade haplotípica existente em populações de *B. thuringiensis*. No entanto, por estar em menor quantidade, a região Norte-Nordeste não alcançou níveis significativos de diferenciação genética em relação à região Sudeste, que está bem melhor representada em número de isolados. Desta forma não se pode afirmar que, para essas regiões, um possível fluxo gênico tenha ocorrido, já que as proporções em número de isolados que compõem essas duas populações são muito desiguais.

Mesmo com os maiores valores de diferenciação obtidos entre populações das regiões Sul e Centro-Oeste, deve ser considerada a possibilidade de trocas genéticas entre as linhagens das diferentes populações tanto quando comparadas as regiões, como quando comparados os isolados da mesma região, com evidências para transferência de DNA tanto intracelular quanto intercelular, determinada pela extensiva presença de elementos transponíveis nos plasmídeos de *B. thuringiensis* (MENDONÇA, 2002).

Deve-se ainda considerar a facilidade com que trocas genéticas ocorrem entre isolados da mesma espécie ou mesmo entre as espécies compreendidas no grupo de *B. cereus*.

Entre isolados da mesma região as distâncias euclidianas (análise multivariada) verificadas em alguns grupos foram relativamente baixas, nulas ou quase nulas (Figuras 3 a 7). Os agrupamentos constituem-se de isolados semelhantes, que compartilham haplótipos também semelhantes, sendo alguns grupos constituídos por uma população clonal de isolados de *B. thuringiensis*.

População clonal de *B. thuringiensis* também foi encontrada por SWIECICKA & MAHILLON (2005). A estrutura clonal de isolados de *B. thuringiensis* do nordeste da Polônia não se correlacionou com a diversidade de genes *cry* encontrada naquela região. Isso enfatiza a importância da transferência horizontal de genes *cry* que ocorre entre isolados selvagens de *B. thuringiensis*.

Os isolados de um mesmo grupo que compartilham o mesmo haplótipo não estão associados a uma maior ou menor porcentagem de mortalidade verificada em *S. frugiperda* (FATORETO, 2002) e em *P. xylostella* (THULER et al., 2007) visto que, dentro de todos os haplótipos, existem isolados altamente eficientes, pouco eficientes ou até mesmo com eficiência nula no controle desses insetos. Apesar de alguns haplótipos serem específicos para determinada região, observou-se também que diversos isolados de diferentes regiões compartilham o mesmo haplótipo, indicando não haver associação de haplótipos com regiões geográficas.

Análises genômicas têm mostrado que uma fração dos genomas bacterianos da espécie (5 a 15%) pode originar-se de outra espécie pela transferência horizontal de

segmentos homólogos ou heterólogos, incluindo elementos transponíveis mediados por plasmídeos ou fagos (MAJEWSKI & COHAN 1999; OCHMAN et al., 2000). Esta observação enfatiza a importância dos eventos de recombinação genética nas bactérias, conduzindo às diferenças profundas entre elas e outros organismos sexuados (eucariotos) que são a base dos conceitos atuais das espécies (COHAN, 2002). Contudo, a especiação nas bactérias requer essencialmente a divergência ecológica, visto que em eucariotos, altamente referidos como seres com reprodução sexuada, há a necessidade de divergências reprodutiva e ecológica (COHAN, 1994).

A despeito destas conclusões, muitos pesquisadores discutem a classificação de *B. thuringiensis* e *B. cereus*: se essas duas bactérias pertencem a uma única espécie ou a duas diferentes. Discutem ainda as semelhanças com outros membros do grupo, como o *B. anthracis*, que segundo HELGASON et al. (2000) deve ser considerado uma linhagem de *B. cereus*, implicando não só na taxonomia, mas em consequências com respeito à virulência e ao potencial de transferência horizontal de genes dentro do grupo de *B. cereus*. Isso se reflete na segurança dos produtos a base de *B. thuringiensis*, já que esta é uma das bactérias que também compõe o grupo a que pertence o *B. cereus*.

CONCLUSÕES

- Isolados comumente utilizados em testes de efetividade a insetos são portadores de genes de enterotoxinas;
- As populações de *B. thuringiensis* se diferenciam geneticamente de acordo com a coleção e região de origem.
- As populações de *B. thuringiensis* se diferenciam entre si, mas existe grande semelhança genética entre isolados provenientes da mesma coleção/região, formando grupos de clones.

REFERÊNCIAS

AGAISSE, H.; GOMINET, M.; ÉKSTAD, O.A.; KOLSTÙ, A.; LERECLUS, D. *PlcR* is a pleiotropic regulator of extracellular virulence factor gene expression in *Bacillus thuringiensis*. **Molecular Microbiology**, Oxford, v.32, n.5, p.1043-1053, 1999.

COHAN, F.M. The effects of rare but promiscuous genetic exchange on evolutionary divergence in prokaryotes. **American naturalist**, Chicago, v.143, p.965-986, 1994.

COHAN, F.M. What are bacterial species? **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v.56, p.457-487, 2002.

DEMPSTER, A.P.; LAIRD, N.M.; RUBIN, D.B. Maximum likelihood from incomplete data using the EM algorithm. **Journal of the Royal Statistical Society**, London, 1977.

DING, Y.; UITTO, V.J.; FIRTH, J.; SALO, T.; HAAPASALO, M.; KONTTINEN, Y.T.; SORSA, T. Modulation of host matrix metalloproteinases by bacterial virulence factors relevant in human periodontal diseases. **Oral Diseases**, Hampshire, v.1, n.4, p.279-286, 1995.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, Auckland, v.1, p.47-50, 2005.

EXCOFFIER, L.; SLATKIN, M. Maximum-likelihood estimation of molecular haplotype frequencies in a diploid population. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v.12, p.921-927, 1995.

FATORETTO, J.C. Associação de bioensaio e caracterização molecular para seleção de isolados de *Bacillus thuringiensis* efetivos contra *Spodoptera frugiperda*. 2002.105f. (Monografia). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2002.

FREDERIKSEN, K.; ROSENQUIST H.; JORGENSEN K.; WILCKS A. Occurrence of natural *Bacillus thuringiensis* contaminants and residues of *Bacillus thuringiensis*-based insecticides on fresh fruits and vegetables. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.72, n.5, p.3435-3440, 2006.

GRANUM, P. E.; O'SULLIVAN, K.; T. LUND. The sequence of the non-haemolytic enterotoxin operon from *Bacillus cereus*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.177, n.2, p.225–229, 1999.

HANSEN, B. M.; HENDRIKSEN, N. B.. Detection of enterotoxic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.67, n.1, p.185-189, 2001.

HELGASON, E.; OKSTAD, O. A.; CAUGANT, D. A.; JOHANSEN H. A.; FOUET, A.; MOCK, M.; HEGNA I.; KOLSTO , A. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*—one species on the basis of genetic evidence. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n.6, p.2627-2630, 2000.

HSIEH, Y. M.; SHEU S. J.; CHEN, Y. L.; TSEN, H. Y. Enterotoxigenic profiles and polymerase chain reaction detection of *Bacillus cereus* group cells and *B. cereus* strains from foods and food-borne outbreaks. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.87, n.4, p.481-490, 1999.

JACKSON, S. G.; GOODBRAND, R. B.; AHMED, R.; KASATIYA, S. *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolated in a gastroenteritis outbreak investigation. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.21, n.2, p.103-105, 1995.

JENSEN, G. B.; LARSEN, P.; JACOBSEN, B. L.; MADSEN, B.; SMIDT, L.; ANDRUP, L. *Bacillus thuringiensis* in fecal samples from greenhouse workers after exposure to *B. thuringiensis*-based pesticides. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.68, n.10, p.4900-4905, 2002.

KO, K. S.; KIM, J.W.; KIM J.M.; KIM, W.; CHUNG, S.; KIM, I. J.; KOOK, Y.H. Population structure of the *Bacillus cereus* group as determined by sequence analysis of six housekeeping genes and the *plcR* gene. **Infection and Immunity**, Washington, v.72, n.9, p.5253-5261, 2004.

LANGE, K. An approximate model of polygenic inheritance. **Genetics**, Austin, v.147, n.3, p.1423-30, 1997.

MAJEWSKI, J.; COHAN, F.M. Adapt globally, act locally: the effect of selective sweeps on bacterial sequence diversity. **Genetics**, Austin, v.152, p.1459-1474, 1999.

MENDONÇA, P. C. Caracterização e seqüenciamento dos plasmídios pMC1 e pMC2 de *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* isolado T01-328. 2002. 53f. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Área de concentração Genética e Melhoramento de Plantas) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2002.

MIGNOT, T.; MOCK, M.; ROBICHON, D.; LANDLER, A., LERECLUS, D., FOUET, A. The incompatibility between the *PlcR*- and *AtxA*-controlled regulons may have selected a nonsense mutation in *Bacillus anthracis*. **Molecular Microbiology**, Salem, v.42, p.1189-1198, 2001.

NOGUCHI, H. Development of *Bacillus thuringiensis* in Japan. In: KIM, L. (Ed.) **Advanced engineered pesticides**. New York: Marcel Dekker, 1993. p. 283–291.

OCHMAN, H.; LAWRENCE, J.G.; GROISMAN, E.A. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. **Nature**, London, v.405, p.299-304, 2000.

PICCHI, S.C.; VILAS-BOAS, L.A.; CERESINI, P.C.; LEMOS, E.G.M.; LEMOS, M.V.F. Strain variability in the DNA immigration control region (ICR) of *Xylella fastidiosa*. **Research in Microbiology**, Paris, v.157, n.3, p.254-262, 2006.

SLAMTI, L.; PERCHAT S.; GOMINET M.; VILAS-BÔAS, G.; FOUET A.; MOCK M.; SANCHIS, V.; CHAUFaux J.; GOHAR M.; LERECLUS, D. Distinct mutations in PlcR explain why some strains of the *Bacillus cereus* group are nonhemolytic. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.186, n.11, p.3531-3538, 2004.

ŚWIECICKA, I.; MAHILLON, J. The clonal structure of *Bacillus thuringiensis* isolates from north-east Poland does not correlate with their cry gene diversity. **Environmental Microbiology**, Oxford, v.7, n.1, p.34-39, 2005.

THULER, A.M.G.; THULER, R.T.; CÍCERO, E.S.; DE BORTOLI, S.A.; LEMOS, M.V.F. Estudo da variabilidade gênica em isolados brasileiros de *Bacillus thuringiensis* para emprego no controle biológico de *Plutella xylostella*. **Boletim de Sanidad Vegetal-Plagas**, Madrid, v. 33, 2007 (no prelo).

VIANA, C. L. T. P. Seleção de isolados de *Bacillus thuringiensis* Berliner efetivos em lagartas de *Plutella xylostella* (L.) (LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE). 2007. 103f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Entomologia Agrícola) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

VILAS-BÔAS, G.T.; PERUCA, A.P.S.; ARANTES, O.M.N. Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, and *Bacillus thuringiensis*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.53,n.6, p.673–687, 2007.

VILAS-BOAS, G.; SANCHIS, V.; LERECLUS, D.; LEMOS, M. V.F.; BOURGUET, D. Genetic differentiation between sympatric populations of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.3, p.1414-1424, 2002.

WEIR, B. S. **Genetic Data Analysis**. 2nd. Ed. Sunderland, MA: Sinauer. 455p, 1996.

WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annals of Eugenics**, London, v. 15, p. 323-54, 1951.

CAPÍTULO 4 – CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS BRASILEIROS DE *Bacillus thuringiensis* E EFICIÊNCIA DE CONTROLE PARA *Plutella xylostella* (L., 1758) (Lepidoptera: Plutellidae)

INTRODUÇÃO

A traça-das-crucíferas, *Plutella xylostella* (L., 1758) (Lepidoptera: Plutellidae), é a praga que provoca as maiores perdas em plantações de brássicas, principalmente repolho, em todas as regiões produtoras do mundo (ULMER et al., 2002). As perdas com a ocorrência desse inseto num plantio podem chegar a 100%, independente do período de desenvolvimento da planta em que ocorre, sendo que o prejuízo excedeu a 1 bilhão de dólares anual, já em 1993 nos Estados Unidos (TALEKAR & SHELTON, 1993).

Na tentativa de conter o problema ocasionado pela traça, o controle químico tem sido o método mais empregado a vários anos, no entanto, sua utilização incorreta tem provocado a seleção cada vez mais freqüente de populações resistentes (CASTELO BRANCO et al., 2003). Para minimizar esse problema, uma das alternativas empregadas é o controle biológico através da aplicação de inseticidas à base da bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis*.

As diversas linhagens de *B. thuringiensis* produzem, em adição às δ -endotoxinas, uma série de outras toxinas que podem ou não participar da ação entomopatogênica. A proteína Cyt, de peso molecular 28 kDa, é uma citolisina de ação inespecífica, sendo acumulada no cristal juntamente com as δ -endotoxinas (LERECLUS et al., 1993). Além desta, as proteínas Vip (“vegetative insecticidal proteins”), também produzidas por muitas linhagens de *B. thuringiensis*, possuem 80-100 kDa e apresentam amplo espectro de hospedeiros (ESTRUCH et al., 1996).

Os resultados de controle obtidos inicialmente com Bt tornaram freqüente sua utilização; no entanto, a maioria dos produtos formulados com essa bactéria, encontrados no mercado, são formulados com *B. thuringiensis* var. *kurstaki* que expressa as toxinas Cry1Aa, Cry1Ab ou Cry1Ac. Isto significa que as ligações das toxinas com o epitélio, no intestino do inseto, ocorrem através dos mesmos receptores de membrana, facilitando o aparecimento de populações resistentes, o que já vem sendo relatado (TANG et al., 1996).

As primeiras observações da expressão de resistência de insetos ao tratamento com preparações de *B. thuringiensis* foram observadas em experimentos com pressão de seleção, em laboratório. Somente para *P. xylostella* foram constatadas populações de campo resistentes a *B. thuringiensis*. Essas populações foram relatadas no Estados Unidos, América Central e Ásia (PEREZ & SHELTON, 1997; TABASHNIK, 1994; WRIGHT et al., 1997; ZHAO et al., 1993).

Para resolver estes problemas, vários podem ser os caminhos, incluindo-se o manejo da resistência (TABASHNIK et al., 1998), que pode ser realizado através da utilização de diferentes bactérias entomopatogênicas eficientes contra a praga; formulações mistas de diferentes bactérias ou de isolados de *B. thuringiensis*, que apresentem vários genes *cry* (isolada ou conjuntamente). Dessa forma muitos pesquisadores e companhias vêm desenvolvendo programas de seleção global ou local para encontrar novos isolados com atividade inseticida aumentada.

Os isolados obtidos por estes programas têm seus genes *cry* identificados, na maioria das vezes, por meio de tecnologias baseadas na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com iniciadores com especificidade para diferentes genes. Além de ser usada com sucesso para determinar a distribuição desses genes em coleções naturais de isolados de *B. thuringiensis* (BEN-DOV et al., 1997; BRAVO et al., 1998; CAROZZI et al., 1991; VILAS-BÔAS & LEMOS, 2004).

Nesse sentido, alguns trabalhos vêm sendo realizados para caracterizar populações de *B. thuringiensis*, eficientes contra *P. xylostella*, isolados de várias regiões do mundo, através de métodos morfológicos, bioquímicos e moleculares (BOBROWSKI et al., 2001; MONERAT et al., 2004, MEDEIROS et al., 2005).

Com base nessas informações, o presente trabalho teve por objetivo caracterizar molecularmente 16 isolados de *B. thuringiensis* e as linhagens *B. thuringiensis* var. *kurstaki* e var. *tenebrionis*, bem como determinar a patogenicidade dos mesmos à traças-crucíferas.

MATERIAL E MÉTODOS

Inicialmente foram selecionados 15 isolados: BR₀₅, BR₀₆, BR₁₁, BR₁₂, BR₁₆, BR₁₇, BR₁₈, BR₂₁, BR₃₇, BR₄₉, BR₅₄, BR₇₅, BR₇₈, BR₈₀ e BR₉₀; além das linhagens HD1 de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* e *B. thuringiensis* var. *tenebrionis*, da coleção do Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA) da FCAV-UNESP/Jaboticabal-SP, para utilização na identificação das subclasses do gene *cry1* e nos bioensaios. Para estes, foram utilizados espécimes de *P. xylostella* provenientes da criação mantida no Laboratório de Biologia e Criação de Insetos da mesma Universidade.

Todos os bioensaios foram realizados em temperatura de 25±1°C, umidade relativa de 70±10% e fotofase de 12h, em sala climatizada.

1. Extração de DNA pelo Kit InstaGene Matrix (Bio-Rad)

Os isolados de *B. thuringiensis* foram previamente cultivados em placas contendo meio NA sólido, por 12 h a 30°C. Para cada isolado uma colônia foi ressuspendida em 1 ml de água estéril em tubos de microcentrífuga e levados à centrifugação por 1 min. a 15.000 x g a 20°C.

Após centrifugação o sobrenadante foi descartado, sendo adicionados 200 µl da Matriz InstaGene Matrix (Bio-Rad) e, em seguida, o material foi incubado em banho-maria a 56°C por 20 min, agitado rigorosamente em vórtex por 10 s e incubado em água fervente (100°C) por 8 min. A amostra foi novamente agitada em “vórtex” por 10 s e centrifugada a 20°C por 3 min. Finalmente, 200 µl do sobrenadante foram colhidos, transferidos para um poço de uma microplaca de polipropileno contendo 96 poços (DNA de um isolado/poço), a qual foi estocada em freezer - 20°C até o momento do uso.

2. Identificação de subclasses do gene *cry1*

A identificação das subclasses do gene *cry1* nos isolados de *B. thuringiensis* estudados foi realizada para cinco subclasses: *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1B*, *cry1C* e *cry1F* (Tabela 1.). Os iniciadores para esses genes foram elaborados e otimizados no laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada.

Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados no trabalho.

Genes	Seqüências	Pares de bases amplificados (pb)	Número de Acesso
<i>cry1Ab</i>	5' ATGAACAGTGCCCTTACAAC 3' 5' TACTTCCTTCTATGCCCTGAG 3'	423	M12661
<i>cry1Ac</i>	5' ATCGCTCGTCTATCGGCATTG 3' 5' AGCCAGCCCTCACGTTCTTC 3'	400	U87793
<i>cry1B</i>	5'AACCCTAACCGAAACGCTG3' 5'AGCACCGGAAGATACTAGAAG 3'	375	M23724
<i>cry1C</i>	5' GAAAGTGTGGAGAACCGAATC 3' 5' TGGGATAACAAGGACCGAAC 3'	616	AY955268
<i>cry1F</i>	5' TGTAGAGCCGTTTGTAGTG 3' 5' GCTTGGGAATAGTGCGAC 3'	645	M63897

As reações de amplificação para estes iniciadores foram conduzidas em um volume de 20 µl contendo: 20 ng de DNA molde, 250 µM de uma solução de dNTPs (10mM); 2,0 mM de MgCl₂; 0,4 µM de cada iniciador; 1,0 U da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen®); solução tampão para a reação de PCR (1X) e água destilada Milli-Q previamente esterilizada (qsp 20 µl). Em todos os lotes de reação realizou-se um controle negativo no qual a quantidade de DNA foi substituída por água Milli-Q, previamente esterilizada.

As reações de amplificação foram realizadas em aparelho termociclador (PTC-100 "Programmable Thermal Controller" - MJ Research, inc.), equipado com circuito

“Hot Bonnet”, onde foi utilizado o seguinte programa: um passo inicial de desnaturação de 5 min a 95°C e 31 ciclos consistindo de um ciclo de desnaturação a 95°C por 1 min; pareamento dos oligonucleotídeos a 48°C por 1 min e extensão a 72°C por 1 min e, ao final dos ciclos, um passo extra de extensão a 72°C por 5 min. Ao fim do programa foi adicionado um passo para a manutenção da amostra a 13°C até a retirada dos tubos do termociclador.

Após as amplificações, adicionou-se às amostras 2 µl de tampão de amostra (“loading buffer” - 0,5% de azul de bromofenol em glicerol 50%). Um volume de 15 µl de cada amostra foi aplicado em gel de agarose a 1,5%, contendo brometo de etídeo (0,5 µg/ml) e submetido à eletroforese horizontal por 2 h, a 70 V, conduzida em tampão TEB 1X (Tris 89 mM, EDTA 2,5 mM e Acido Bórico 89 mM com pH 8,3), também adicionado de brometo de etídeo (0,5 µg/ml). Em todas as eletroforeses realizadas foi adotado o emprego de uma amostra de DNA, com fragmentos de tamanhos conhecidos, múltiplos de 1kb “1kb DNA ladder”, produzida pela Invitrogen®, a qual serviu como referência de migração eletroforética para verificação dos tamanhos dos fragmentos obtidos nas reações de amplificação.

Os géis de agarose foram visualizados sob luz UV e fotodocumentados em equipamento GEL DOC 2000 - Bio-Rad, através do software Quantity-one.

3. Bioensaios

O bioensaio foi realizado com 16 isolados de *B. thuringiensis*, além da linhagem padrão *B. thuringiensis* var. *kurstaki* – HD-1 (Lepidoptera-específico), a linhagem padrão *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* (Coleoptera-específico) e duas testemunhas, sendo uma com água destilada esterilizada e outra composta por água destilada esterilizada e 0,05% de Tween 20® (espalhante adesivo).

Os isolados foram cultivados em placas de Petri com meio de cultura Agar Nutriente “NA” (extrato de carne 3g/L, peptona bacteriológica 5g/L e Ágar 15g/L) e incubados a 30°C, durante 5 dias, permitindo assim completa esporulação e liberação

de cristais. Após este período, todo conteúdo bacteriano foi transferido, com auxílio de alça de platina, para tubo Falcon contendo 10 ml de água Milli-Q autoclavada e 0,05% de Tweem 20[®]. A suspensão obtida foi homogeneizada por agitação em tipo Vórtex e a partir desta, foram feitas duas suspensões seriadas, sendo a primeira 10^{-1} e a segunda 10^{-2} . A suspensão seriada 10^{-2} foi utilizada para contagem de esporos em câmara de NeuBauer, para padronização a uma concentração de 3×10^8 esporos/ml, que constituiu a suspensão testada no bioensaio.

Para cada isolado foram utilizados 5 discos de couve com diâmetro de 8 cm, que foram pulverizados com volume de 0,5 ml da suspensão por face do disco, além das testemunhas, para as quais seguiu-se os mesmos procedimentos. A pulverização foi realizada com auxílio de uma pistola para pintura, tipo aerógrafo, acoplada a um compressor da marca Schulz Modelo MS 2.3 com pressão operacional de 25 lbf/pol², sob capela de exaustão. Após a secagem por duas horas em condição ambiente, os discos de folha foram colocados sobre papéis filtro circulares, levemente umedecidos com água, dentro de placas de Petri. Sobre cada disco foliar colocou-se 12 lagartas de *P. xylostella* de segundo ínstar para alimentação (Figura 1).

As placas com os tratamentos foram mantidas em sala climatizada sob temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 14 horas, sendo que a primeira avaliação foi feita com 24 horas, devido ao modo de ação da bactéria, e as demais diariamente até o início da formação da pré-pupa.

Avaliou-se a mortalidade causada pelos isolados e os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e confrontados pelo teste de Tukey ($p=0,05$).



Figura 1. Seqüência do bioensaio com *Bacillus thuringiensis* em lagartas de *Plutella xylostella*: A: suspensão esporos/cristais em tubo Falcon; B: capela de exaustão para pulverização associada ao compressor; C: pistola pulverizando a suspensão sobre o disco de couve; D: secagem dos discos sob condições ambiente; E: placas de Petri para o confinamento; F: experimento em sala climatizada (VIANA, 2007).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise molecular com utilização dos iniciadores específicos para os genes *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1B*, *cry1C* e *cry1F* gerou produtos de PCR com fragmentos de tamanho esperado (423, 400, 375, 616 e 645, respectivamente), indicando a presença desses genes em diferentes isolados (Figura 2A, B e C) com exceção da linhagem *B. thuringiensis* var. *tenebrionis*, utilizada como controle negativo para o gene *cry1*.

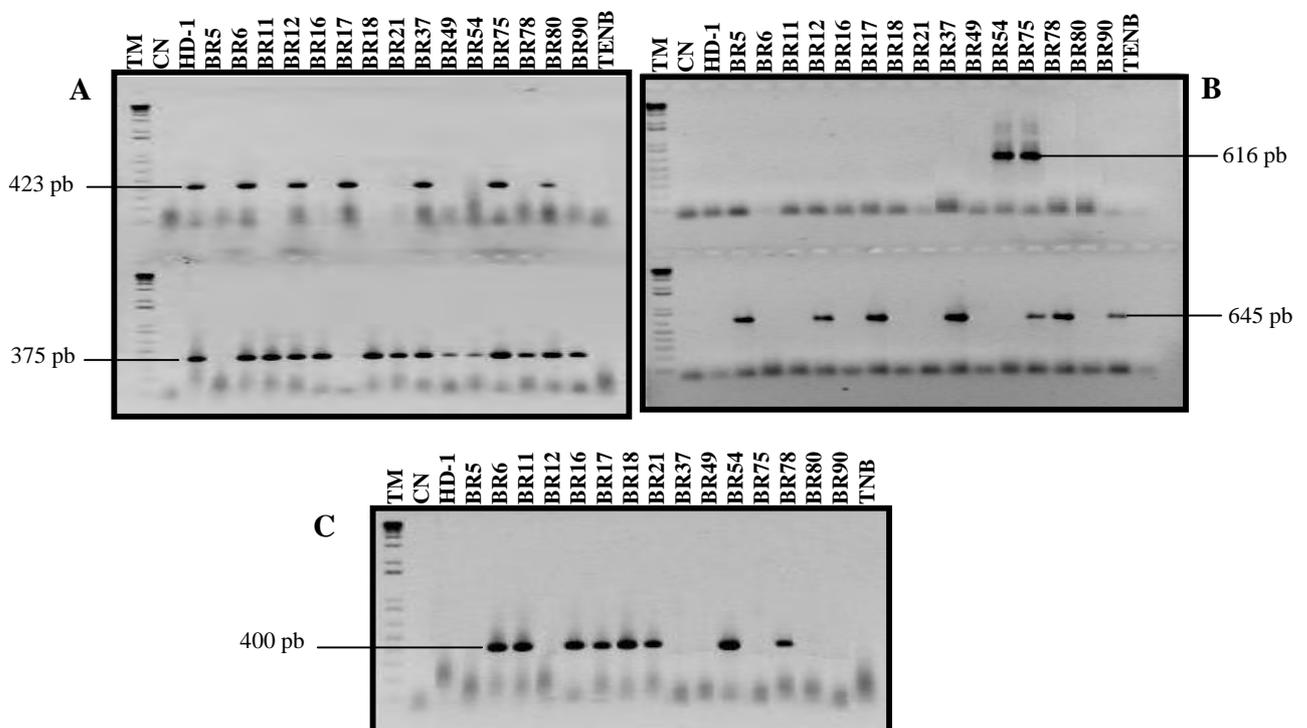


Figura 2. Eletroforogramas do material amplificado com os iniciadores específicos. **A:** *cry1Ab* e *cry1B*. **B:** *cry1C* e *cry1F*. **C:** *cry1Ac*. TM: Tamanho Molecular: 1kb plus DNA ladder. CN: Controle Negativo. TENB: *B. thuringiensis* var. *tenebrionis*. BR₀₅ a BR₉₀: isolados de *B. thuringiensis*.

Os isolados estudados apresentaram perfis gênicos muito variados, uma vez que pela utilização da análise por PCR foi possível identificar cinco genes *cry*, em 16 isolados de *B. thuringiensis*. Desses, a maior frequência encontrada foi para o gene *cry1B*, encontrado em 14 isolados, seguido por *cry1Ac* (8 isolados) e *cry1F* (8), *cry1Ab* (7) e *cry1C* (2) (Tabela 2).

Tabela 2. Conteúdo gênico de isolados de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* de diferentes regiões brasileiras e atividade inseticida para lagartas de *Plutella xylostella*.

Isolados	Origem	<i>cry1Ab</i>	<i>cry1Ac</i>	<i>cry1B</i>	<i>cry1C</i>	<i>cry1F</i>	Mortalidade (%)
HD1	Bacillus Stock Center (EUA)	+	-	+	-	-	100,00
BR₀₅	Cubatão/SP	-	-	-	-	+	98,00
BR₀₆	Londrina/PR	+	+	+	-	-	100,00
BR₁₁	Londrina/PR	-	+	+	-	-	100,00
BR₁₂	Londrina/PR	+	-	+	-	+	100,00
BR₁₆	Londrina/PR	-	+	+	-	-	100,00
BR₁₇	Londrina/PR	+	+	-	-	+	100,00
BR₁₈	Londrina/PR	-	+	+	-	-	100,00
BR₂₁	Ribeirão Preto/SP	-	+	+	-	-	100,00
BR₃₇	Grãos armazenados	+	-	+	-	+	100,00
BR₄₉	Londrina/PR	-	-	+	-	-	100,00
BR₅₄	Londrina/PR	-	+	+	+	-	100,00
BR₇₅	Grãos armazenados	+	-	+	+	+	100,00
BR₇₈	Grãos armazenados	-	+	+	-	+	100,00
BR₈₀	Grãos armazenados	+	-	+	-	+	100,00
BR₉₀	Grãos armazenados	-	-	+	-	+	100,00
var. tenebrionis	Bacillus Stock Center (EUA)	-	-	-	-	-	10,00
Test.		-	-	-	-	-	12,00

(+) presença, (-) ausência do gene; Test. = Testemunha (água+tween)

A variação na combinação desses genes formou vários grupos, incluindo os diferentes isolados, sendo possível demonstrar que a maior parte dos isolados apresentaram mais de um gene *cry*. Dentre os 16 isolados, 43,75% apresentaram três genes *cry*, 37,50% apresentaram dois, 12,50% apresentaram apenas um e 6,25% apresentaram quatro (Figura 3A). Foram observadas dessa forma, onze combinações de genes nos 16 isolados, sendo que quatro isolados apresentaram a combinação dos genes *cry1Ac+cry1B* (maior frequência), três a combinação *cry1Ab+cry1B+cry1F* e os outros nove isolados apresentaram combinações diversificadas (Figura 2B).

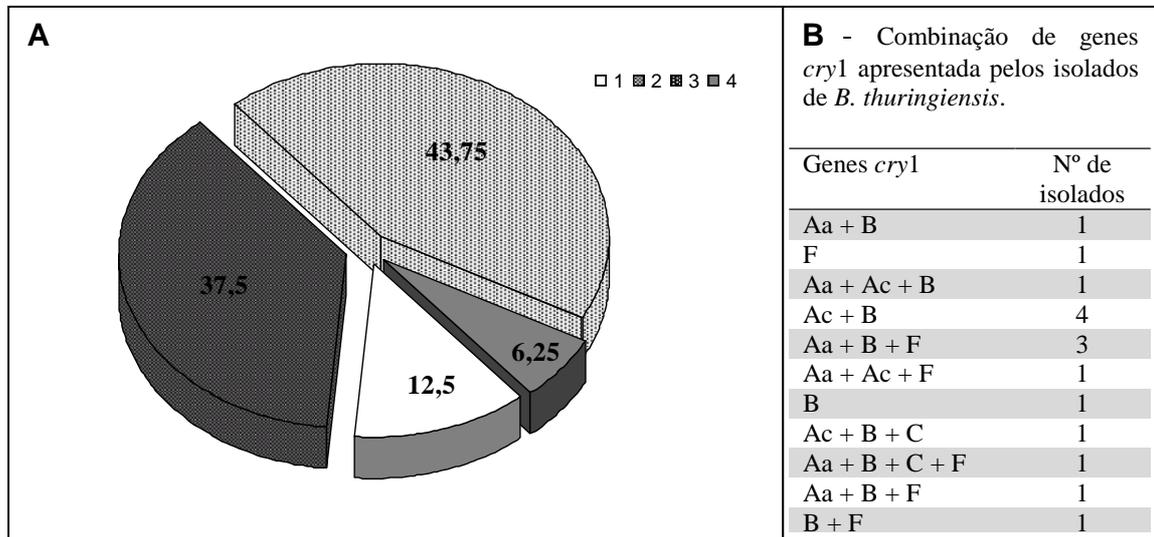


Figura 3. A) Frequência de genes *cry* nos isolados; **B)** Perfil gênico apresentado pelos isolados de *Bacillus thuringiensis*.

Em função dos resultados obtidos não é possível se traçar uma correlação entre a presença/ausência dos genes *cry* estudados com a mortalidade ocasionada no bioensaio com *P. xylostella*, uma vez que todos os isolados utilizados ocasionaram mortalidades superiores a 98%, igualando-se ao tratamento padrão com o isolado HD-1 de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (Tabela 2).

Os principais resultados de controle com *B. thuringiensis* var. *kurstaki* foram obtidos com produtos encontrados no mercado, formulados com essa bactéria, que expressa as toxinas Cry1Ab, Cry1Ab ou Cry1Ac. As ligações dessas toxinas com o epitélio, no intestino do inseto ocorrem através dos mesmos receptores de membrana, facilitando o aparecimento de populações resistentes, o que já vem sendo relatado. O aparecimento de populações de *P. xylostella* resistentes à bactéria, em nível de campo, é cada vez mais freqüente em todo o mundo (PEREZ & SHELTON, 1997; TABASHNIK, 1994; WRIGHT et al., 1997; ZHAO et al., 1993), confirmando os resultados obtidos em laboratório, com o surgimento de novas populações resistentes pela pressão de seleção (TANG et al., 1996).

Resultados positivos de controle de *P. xylostella* com *B. thuringiensis* foram observados recentemente por CASTELO BRANCO et al. (2003), chegando a 100% de mortalidade para larvas de segundo ínstar de *P. xylostella*. DIAS et al. (2004) também relataram bons resultados para diferentes pragas, em trabalho com *B. thuringiensis* var. *kurstaki* e var. *aizawai*, em formulações comerciais. No entanto, tais resultados são geralmente observados em populações de campos produtores onde produtos a base dessa bactéria não são largamente empregados.

Tendo em vista os casos freqüentes de resistência, uma das formas de se manejá-la em populações de campo é a utilização de novos isolados de *B. thuringiensis* que apresentem perfis diferenciados quanto ao conteúdo de genes *cry*, como os encontrados nos isolados deste estudo.

A presença dos diferentes genes *cry* nos isolados estudados, obtidos pela análise de PCR, não significa que os mesmos estão sendo expressos, no entanto dão um forte indício de que estes isolados poderão ser empregados na construção de formulações comerciais efetivas contra diferentes pragas. Gera-se ainda, a possibilidade de novos estudos relacionados à expressão e inserção desses genes em plantas, mediante comprovação de sua atuação nas mortalidades geradas nos ensaios.

REFERÊNCIAS

BEN-DOV, E.; ZARISTSKY, A.; DAHAN, E.; BARAK, Z.; SINAI, R.; MANASHEROB, R.; KHAMRAEV, A.; TROITSKAYA, E.; DUBITSKY, A.; BERENZINA, N.; MARGALITH, Y. Extended screening by PCR for seven cry-group genes from field-collected strains of *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.63, n.12, p.4883-4890, 1997.

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

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

CAROZZI, N.B.; KRAMER, V.C.; WARREN, G.W.; EVOLA, S.; KOZIEL, M.G. Prediction of insectidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.57, n.11, p.3057-3061, 1991.

CASTELO BRANCO, M.; FRANÇA, F.H.; PONTES, L.A.; AMARAL, P.S.T. Avaliação da suscetibilidade a inseticidas em populações de traça-das-crucíferas de algumas áreas do Brasil. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.21, n.3, p.549-552, 2003.

DIAS, D.G.S.; SOARES, C.M.S.; MONNERAT, R. Avaliação de larvicidas de origem microbiana no controle da traça-das-crucíferas em couve-flor. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.22, n.3, p.553-556, 2004.

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

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

MEDEIROS, P.T.; FERREIRA, M.N.; MARTINS, E.S.; GOMES, A.C.M.M.; FALCÃO, R.; DIAS, J.M.C.S.; MONNERAT, R.G. Seleção e caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas no controle da traça-das-crucíferas *Plutella xylostella*. **Pesquisa Agropecuária brasileira**, Brasília, v.40, n.11, p.1145-1148, 2005.

MONNERAT, R.G.; LEAL-BERTIOLI, S.C.M.; BERTIOLI, D.J.; BUTT, T.M.; BORDAT, D. Caracterização de populações geograficamente distintas da traça-das-crucíferas por susceptibilidade ao *Bacillus thuringiensis* Berliner e RAPD-PCR. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.22, n.3, p.607-609, 2004.

PEREZ, C.J.; SHELTON, A.M. Resistance of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) to *Bacillus thuringiensis* Berliner in Central America. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.90, n.1, p.87-93, 1997.

TABASHNIK, B.E. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v.39, p.47-79, 1994.

TABASHNIK, B.E.; LIU, Y.B.; MALVAR, T.; HECKEL, D.G.; MASSON, L.; FERRÉ, J. Insect resistance to *Bacillus thuringiensis*: uniform or diverse? **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, London, v.353, n.1376, p.1751-1756, 1998.

TALEKAR, N. S.; SHELTON, A.M. Biology, ecology and management of the diamondback moth. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v.38, p.275-301, 1993.

TANG, J.D.; SHELTON, A.M.; VAN RIE, J.; DE ROECK, S.; MOAR, W.J.; ROUSH, R.T.; PEFEROEN, M. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* spore and crystal protein to resistant diamondback moth (*Plutella xylostella*). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.62, n.2, p.564-569, 1996.

ULMER, B.C.; GILLOTT, C.; WOODS, D.; ERLANDSON, M. Diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.), feeding and oviposition preferences on glossy and waxy *Brassica rapa* (L.) lines. **Crop Protection**, Guildford, v.21, n.4, p.327-331, 2002.

VILAS-BÔAS, G.T.; LEMOS, M.V. Diversity of *cry* genes and genetic characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from Brazil. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.50, n.8, p.605-613, 2004.

WRIGHT, D.J.; IQBAL, M.; GRANERO, F.; FERRÉ, J. A change in a single midgut receptor in the diamondback moth (*Plutella xylostella*) is only part responsible for field resistance to *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.63, n.5, p.1814-1819, 1997.

ZHAO, J.Z.; ZHU, G.R.; ZHU, Z.L.; WANG, W.Z. Resistance of diamondback moth to *Bacillus thuringiensis* in China. **Resistant Pest Management**, East Lansing, v.5, n.1, p.11-12, 1993.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Muitos trabalhos têm sido realizados para avaliar a atividade inseticida de isolados de *B. thuringiensis* eficientes no controle de insetos-praga e outros associam a mortalidade ocasionada ao conteúdo de genes *cry* apresentado por tais isolados. Esses conhecimentos podem levar ao conhecimento de linhagens com novas especificidades inseticidas e mais potentes.

A análise de estrutura populacional de linhagens de *B. thuringiensis* efetuada neste trabalho constatou diferenças genéticas entre populações de diferentes coleções e regiões, de acordo com a origem. No entanto, apesar de alguns haplótipos serem específicos para determinada região, observou-se que diversos isolados de diferentes regiões compartilham o mesmo haplótipo, indicando não haver associação de haplótipos com regiões geográficas. Desta forma, as populações de *B. thuringiensis* provenientes de diferentes coleções e regiões de origem, se diferenciam entre si, mas revelam grande semelhança genética entre isolados provenientes da mesma coleção/região.

No entanto, outras características genéticas devem ser consideradas antes da utilização de isolados de *B. thuringiensis*, em programas de controle biológico.

Neste trabalho foi avaliada a presença de diferentes genes *cry1* nos isolados estudados, obtidos pela análise de PCR. Contudo, isso não significa que os mesmos estão sendo expressos, mas dão um forte indício de que estes isolados poderão ser empregados em programas de controle biológico contra diferentes pragas, o que levaria à formulação dos mesmos ou ainda possibilitaria novos estudos relacionados à expressão e inserção desses genes em plantas, mediante a comprovação de sua atuação nas mortalidades geradas nos ensaios. Por sua constituição genética diferenciada, poderiam ser utilizados no manejo de populações de campo resistentes, uma vez que alguns novos isolados de *B. thuringiensis* apresentam perfis diferenciados dos comumente utilizados em formulações comerciais, quanto ao conteúdo de genes *cry*, como os encontrados nos isolados deste estudo.

Os resultados obtidos, nas análises da variabilidade gênica nas coleções analisadas, destacam as coleções de Jaboticabal e Piracicaba como melhores fontes de isolados promissores para uso em programas de Controle Biológico de pragas da ordem Lepidoptera, considerando o conjunto analisado neste trabalho. Destaca-se, sobretudo, o Brasil como uma fonte potencialmente rica em isolados de *B. thuringiensis*.

A produção das toxinas a partir de novos isolados de *B. thuringiensis* demanda estudos mais detalhados, principalmente com relação à segurança no emprego de tais produtos. A utilização de isolados de *B. thuringiensis* em programas de controle biológico passa previamente pela caracterização quanto ao conteúdo e expressão de enterotoxinas, pois sua utilização em culturas de consumo “in natura” pode resultar em casos de envenenamento alimentar, quando as mesmas se fazem presentes, colocando em risco a segurança de seres humanos, pela exposição oral a este organismo ou mesmo pela utilização enganada de organismos semelhantes, erroneamente caracterizadas.

Foi constatada a presença de genes de enterotoxinas em alguns isolados caracterizados neste estudo, e que apresentaram alta eficiência contra *P. xylostella*, um inseto-praga da ordem Lepidoptera. Tais resultados podem indicar a possibilidade de riscos à saúde humana se os mesmos fossem utilizados sem que sejam tomadas as devidas precauções.

ANEXO

Tabela completa de haplótipos.

Loco		<i>hblA</i>			<i>plcR</i>			<i>nheBC</i>		<i>cry1</i>	
Polimorfismo		Ap	<i>MbolI</i>	<i>XbaI</i>	Ap	<i>AluI</i>	<i>HaeIII</i>	Ap	<i>DraI</i>	<i>TaqI</i>	Ap
Alelo		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Nº do haplótipo	Isolado										
	Br3										
	R117										
	R174										
	R246										
	R251										
	R252										
	R253										
	R255										
	R262										
	1062A										
	1067E										
	1115A										
	32.7L										
1	890BB	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0
	Br4										
	Br20										
	Br44										
	Br57										
	Br66										
	J3										
	48.1A										

Loco		<i>hblA</i>			<i>plcR</i>			<i>nheBC</i>			<i>cry1</i>
Polimorfismo		Ap	<i>MbolI</i>	<i>XbaI</i>	Ap	<i>AluI</i>	<i>HaeIII</i>	Ap	<i>DraI</i>	<i>TaqI</i>	Ap
Alelo		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Nº do haplótipo	Isolado										
	933D2.B										
	933D2.F										
	933D2.G										
	933D2.H										
	933G										
	933P										
	937B										
	937G										
	938A										
	938E										
	939D										
	941CL										
	946B										
2	948G	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
	Br5										
	Br43										
	Br45										
	Br47										
	Br53										
	Br60										
	Br65										
	Br68										

Loco		<i>hblA</i>			<i>plcR</i>			<i>nheBC</i>			<i>cry1</i>
Polimorfismo		Ap	<i>MbolI</i>	<i>XbaI</i>	Ap	<i>AluI</i>	<i>HaeIII</i>	Ap	<i>DraI</i>	<i>TaqI</i>	Ap
Alelo		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Nº do haplótipo	Isolado										
	Br70										
	Br71										
	Br72										
	Br78										
	Br82										
	Br90										
	E44										
	R135										
	R184										
	R230										
3	R232	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
	Br6										
	Br7										
	Br8										
	Br9										
	Br10										
	Br11										
	Br16										
	Br17										
	Br18										
	Br21										
	Br49										

Loco		<i>hblA</i>			<i>plcR</i>			<i>nheBC</i>			<i>cry1</i>
Polimorfismo		Ap	<i>MbolI</i>	<i>XbaI</i>	Ap	<i>AluI</i>	<i>HaeIII</i>	Ap	<i>DraI</i>	<i>TaqI</i>	Ap
Alelo		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Nº do haplótipo	Isolado										
	T3A.140										
	T.3A259										
	T07.196										
	E28										
	E39										
	E40										
	E42										
	E43										
	E45										
	E46										
	E47										
	E49										
	E50										
	12.61A										
	21.5A										
	24.43A										
	R121										
	R122										
	R123										
	R125										
	R132										
	R140										

Loco		<i>hblA</i>			<i>plcR</i>			<i>nheBC</i>			<i>cry1</i>
Polimorfismo		Ap	<i>MbolI</i>	<i>XbaI</i>	Ap	<i>AluI</i>	<i>HaeIII</i>	Ap	<i>DraI</i>	<i>TaqI</i>	Ap
Alelo		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Nº do haplótipo	Isolado										
	R154										
	R155										
	R156										
	R169										
	R205										
	R222										
	R228										
	930										
	1061B										
	1074A										
	1074B										
	1074F										
	1074H										
	1109I										
	1121B										
	1130C										
	1130H										
	1130I										
	1134B										
	1134C										
	1140C										
	1190D										

Loco		<i>hblA</i>			<i>plcR</i>			<i>nheBC</i>			<i>cry1</i>
Polimorfismo		Ap	<i>MbolI</i>	<i>XbaI</i>	Ap	<i>AluI</i>	<i>HaeIII</i>	Ap	<i>DraI</i>	<i>TaqI</i>	Ap
Alelo		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Nº do haplótipo	Isolado										
	26.7L										
	39.7L										
	40.7L										
	41.7L										
	42.7L										
	43.7L										
	44.7L										
	45.7L										
	46.7L										
	48.7L										
	858B2										
	939FD										
	939G										
	944B										
	946I										
	948H										
4	965A	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Br12										
	940B										
5	941FD	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1
	Br13										
	Br32										

Loco		<i>hblA</i>			<i>plcR</i>			<i>nheBC</i>			<i>cry1</i>
Polimorfismo		Ap	<i>MbolI</i>	<i>XbaI</i>	Ap	<i>AluI</i>	<i>HaeIII</i>	Ap	<i>DraI</i>	<i>TaqI</i>	Ap
Alelo		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Nº do haplótipo	Isolado										
	Br34										
	Br67										
	E15										
	E26										
	E27										
	E41										
	R128										
	R136										
	R150										
	R197										
	R208										
	R209										
	R210										
	R213										
	R215										
	R218										
	697										
	948										
	971										
	1071										
	11.7L										
	16.7L										

Loco		<i>hblA</i>			<i>plcR</i>			<i>nheBC</i>			<i>cry1</i>
Polimorfismo		Ap	<i>MbolI</i>	<i>XbaI</i>	Ap	<i>AluI</i>	<i>HaeIII</i>	Ap	<i>DraI</i>	<i>TaqI</i>	Ap
Alelo		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Nº do haplótipo	Isolado										
	18.7L										
	19.7L										
	2.7L										
	22.7L										
	24.7L										
	31.7L										
	35.7L										
	36.7L										
	37.7L										
	4.7L										
	5.7L										
	6.7L										
	7.7L										
	8.7L										
	857AC2										
	858AB3										
	858AB4										
	858AB5										
	858B1										
	862CF1										
	862CF2										
	868C3										

Loco		<i>hblA</i>			<i>plcR</i>			<i>nheBC</i>			<i>cry1</i>
Polimorfismo		Ap	<i>MbolI</i>	<i>XbaI</i>	Ap	<i>AluI</i>	<i>HaeIII</i>	Ap	<i>DraI</i>	<i>TaqI</i>	Ap
Alelo		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Nº do haplótipo	Isolado										
	868C5										
	868C6										
	868C7										
	868C8										
	884A1.G										
	885CL										
	887AA										
	888AD										
	889E										
	889GC										
	889GG										
	9.7L										
	927A9										
	927A9.15										
	927A9.4										
	927B										
	927C										
	927D										
	927F										
	927G										
	927N										
	927R										

Loco		<i>hblA</i>			<i>plcR</i>			<i>nheBC</i>			<i>cry1</i>
Polimorfismo		Ap	<i>MbolI</i>	<i>XbaI</i>	Ap	<i>AluI</i>	<i>HaeIII</i>	Ap	<i>DraI</i>	<i>TaqI</i>	Ap
Alelo		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Nº do haplótipo	Isolado										
	927X										
	933O										
	937F										
	940H										
	940I1C										
	941CF										
	941CG										
	941D										
	941FB										
	941G										
	941I										
	946C										
	946H										
	946JR										
	946L										
	952A										
	955A										
	957A										
	957BJ										
	964A										
	964C										
	964D										

Loco		<i>hblA</i>			<i>plcR</i>			<i>nheBC</i>			<i>cry1</i>
Polimorfismo		Ap	<i>MbolI</i>	<i>XbaI</i>	Ap	<i>AluI</i>	<i>HaeIII</i>	Ap	<i>DraI</i>	<i>TaqI</i>	Ap
Alelo		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Nº do haplótipo	Isolado										
	969B										
	976B										
	976C										
	986A										
	986H										
	986L										
	986M										
6	986N	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
	Br14										
	Br19										
	Br36										
	J1										
	100.27										
	106.12										
	2.18A										
	3.21A										
	R126										
	R127										
	R171										
	17.7L										
	885CJ										
	937K										

Loco		<i>hblA</i>			<i>plcR</i>			<i>nheBC</i>			<i>cry1</i>
Polimorfismo		Ap	<i>MbolI</i>	<i>XbaI</i>	Ap	<i>AluI</i>	<i>HaeIII</i>	Ap	<i>DraI</i>	<i>TaqI</i>	Ap
Alelo		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Nº do haplótipo	Isolado										
	938C										
	940CC										
	946F										
	947A										
	951AF										
	951AG										
	951AL										
7	951B	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0
	Br15										
	Br26										
	Br35										
	R129										
	R130										
	R217										
	R239										
	1074E										
8	946K	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0
	Br27										
	E7										
	E22										
	R112										
	R114										

Loco		<i>hblA</i>			<i>plcR</i>			<i>nheBC</i>			<i>cry1</i>
Polimorfismo		Ap	<i>MbolI</i>	<i>XbaI</i>	Ap	<i>AluI</i>	<i>HaeIII</i>	Ap	<i>DraI</i>	<i>TaqI</i>	Ap
Alelo		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Nº do haplótipo	Isolado										
	R115										
	R118										
	R119										
	R149										
	R160										
	R170										
	R172										
	R175										
	R179										
	R191										
	R194										
	R198										
	R212										
	R247										
	R250										
	R274										
	R276										
	R280										
	702										
	939										
	963										
	981										

Loco		<i>hblA</i>			<i>plcR</i>			<i>nheBC</i>			<i>cry1</i>
Polimorfismo		Ap	<i>MbolI</i>	<i>XbaI</i>	Ap	<i>AluI</i>	<i>HaeIII</i>	Ap	<i>DraI</i>	<i>TaqI</i>	Ap
Alelo		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Nº do haplótipo	Isolado										
	999										
	1142										
	1001B										
	1059B										
	1059C										
	1060D										
	1061C										
	1063B										
	1063C										
	1063D										
	1066B										
	1068E										
	1121C										
	1121D										
	1127B										
	1136A										
	12.7L										
	27.7L										
	28.7L										
	69.24A										
	701B										
	842C										

Loco		<i>hblA</i>			<i>plcR</i>			<i>nheBC</i>			<i>cry1</i>
Polimorfismo		Ap	<i>MbolI</i>	<i>XbaI</i>	Ap	<i>AluI</i>	<i>HaeIII</i>	Ap	<i>DraI</i>	<i>TaqI</i>	Ap
Alelo		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Nº do haplótipo	Isolado										
	857B										
	868C1										
	868C2										
	884A1.A										
	884A1.B										
	884A1.C										
	884A3										
	884A3.A										
	884A3.B										
	884A3.D										
	884A3.E										
	884A3.G										
	884A3.I										
	884A5.B										
	884A7										
	890BA										
	927A										
	927A2										
	927A3										
	927A4										
	927A6										
	927A7										

Loco		<i>hblA</i>			<i>plcR</i>			<i>nheBC</i>			<i>cry1</i>
Polimorfismo		Ap	<i>MbolI</i>	<i>XbaI</i>	Ap	<i>AluI</i>	<i>HaeIII</i>	Ap	<i>DraI</i>	<i>TaqI</i>	Ap
Alelo		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Nº do haplótipo	Isolado										
	927A7.10										
	927A7.4										
	927A9.1										
	927A9.10										
	927A9.12										
	927A9.13										
	927A9.17										
	927A9.19										
	927A9.21										
	927A9.5										
	927A9.7										
	927A9.8										
	927K										
	933D2.C										
	933D2A										
	933E										
	933F										
	939B										
	939D.3										
	940J										
	941CC										
	941CD										

Loco		<i>hblA</i>			<i>plcR</i>			<i>nheBC</i>			<i>cry1</i>
Polimorfismo		Ap	<i>MbolI</i>	<i>XbaI</i>	Ap	<i>AluI</i>	<i>HaeIII</i>	Ap	<i>DraI</i>	<i>TaqI</i>	Ap
Alelo		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Nº do haplótipo	Isolado										
	941J										
	943A										
	943B										
	945D										
	946J										
	946JO										
	952B										
	952C										
	957BK										
	964B										
	971H										
	977D										
	977F										
	987B										
9	CST23	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
	Br37										
	Br80										
	Br86										
	Br93										
	E48										
	R120										
	R131										

Loco		<i>hblA</i>			<i>plcR</i>			<i>nheBC</i>			<i>cry1</i>
Polimorfismo		Ap	<i>MbolI</i>	<i>XbaI</i>	Ap	<i>AluI</i>	<i>HaeIII</i>	Ap	<i>DraI</i>	<i>TaqI</i>	Ap
Alelo		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Nº do haplótipo	Isolado										
	R139										
	R141										
	R144										
	R145										
	R146										
	R157										
	R158										
	R161										
	R162										
	R168										
	R173										
	R180										
	R181										
	R199										
	R224										
	R227										
	R258										
	R259										
	R277										
	1063A										
	1119A										
	1119B										

Loco		<i>hblA</i>			<i>plcR</i>			<i>nheBC</i>			<i>cry1</i>
Polimorfismo		Ap	<i>MbolI</i>	<i>XbaI</i>	Ap	<i>AluI</i>	<i>HaeIII</i>	Ap	<i>DraI</i>	<i>TaqI</i>	Ap
Alelo		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Nº do haplótipo	Isolado										
	1119C										
	1122D										
	1124B										
	1124D										
	1124E										
	1125A										
	1127A										
	1129A										
	1129D										
	1130D										
	1130G										
	1135C										
	1139B										
	1139H										
	1140B										
	1150C										
	1190E										
	47.7L										
	939E										
	939FA										
	939FB										
	939FC										

Loco		<i>hblA</i>			<i>plcR</i>			<i>nheBC</i>			<i>cry1</i>
Polimorfismo		Ap	<i>MbolI</i>	<i>XbaI</i>	Ap	<i>AluI</i>	<i>HaeIII</i>	Ap	<i>DraI</i>	<i>TaqI</i>	Ap
Alelo		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Nº do haplótipo	Isolado										
	939N										
	939S										
	940I										
	941FC										
	961A										
10	961B	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1
	Br38										
	Br91										
11	R273	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	Br41										
	Br54										
	Br55										
	Br79										
	Br81										
	Br94										
	Br96										
	Br97										
	Br98										
	Br99										
	Br100										
	49.19A										
	R96										

Loco		<i>hblA</i>			<i>plcR</i>			<i>nheBC</i>			<i>cry1</i>
Polimorfismo		Ap	<i>MbolI</i>	<i>XbaI</i>	Ap	<i>AluI</i>	<i>HaeIII</i>	Ap	<i>DraI</i>	<i>TaqI</i>	Ap
Alelo		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Nº do haplótipo	Isolado										
	R221										
12	1120J	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1
	Br42										
	Br56										
	1.31A										
	13.32A										
	960										
	1067I										
13	965E	1	1	1	0	0	0	1	1	2	0
	Br46										
14	Br48	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
	Br50										
	Br63										
15	Br77	1	2	1	0	0	0	1	1	1	1
16	Br51	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1
17	Br52	0	0	0	0	0	0	1	1	2	0
	Br58										
18	Br75	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1
	Br61										
19	Br62	1	4	1	0	0	0	1	1	1	1
20	Br64	1	3	1	0	0	0	1	1	1	1
	Br69										

Loco		<i>hblA</i>			<i>plcR</i>			<i>nheBC</i>			<i>cry1</i>
Polimorfismo		Ap	<i>MbolI</i>	<i>XbaI</i>	Ap	<i>AluI</i>	<i>HaeIII</i>	Ap	<i>DraI</i>	<i>TaqI</i>	Ap
Alelo		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Nº do haplótipo	Isolado										
	R219										
	R223										
	1074C										
	1074D										
	1074I										
38	1132D	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
	E13										
	1006										
	701A										
	933K										
	933L										
	933M										
	937C										
	937I										
39	951A	1	1	1	0	0	0	1	1	3	0
40	R113	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
	R148										
	R165										
	R166										
	R177										
	R249										
	R254										

Loco		<i>hblA</i>			<i>plcR</i>			<i>nheBC</i>			<i>cry1</i>
Polimorfismo		Ap	<i>MbolI</i>	<i>XbaI</i>	Ap	<i>AluI</i>	<i>HaeIII</i>	Ap	<i>DraI</i>	<i>TaqI</i>	Ap
Alelo		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Nº do haplótipo	Isolado										
	R257										
	R267										
	1128										
	1109K										
	1132A										
	1136B										
	1138A										
	1139D										
41	1139F	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1
	R190										
42	R201	1	1	1	1	1	2	0	0	0	0
	R193										
	R200										
43	R203	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1
44	R196	0	0	0	1	2	1	1	1	1	0
45	R206	1	1	3	1	1	1	1	1	1	1
	R229										
	928										
	879C										
	948C										
46	951AI	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0
	R233										

Loco		<i>hblA</i>			<i>plcR</i>			<i>nheBC</i>			<i>cry1</i>
Polimorfismo		Ap	<i>MbolI</i>	<i>XbaI</i>	Ap	<i>AluI</i>	<i>HaeIII</i>	Ap	<i>DraI</i>	<i>TaqI</i>	Ap
Alelo		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Nº do haplótipo	Isolado										
	R235										
	959										
	1069C										
	946E										
47	965L	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1
48	R238	1	1	1	1	1	2	1	1	3	0
	R241										
	973										
	1067B										
	1067D										
	1068F										
	1069A										
	1070A										
	1070B										
	15.7L										
	933C										
	937H										
	938B										
	941F										
	941L										
	957BB										
	965C										

Loco		<i>hblA</i>			<i>plcR</i>			<i>nheBC</i>			<i>cry1</i>
Polimorfismo		Ap	<i>MbolI</i>	<i>XbaI</i>	Ap	<i>AluI</i>	<i>HaeIII</i>	Ap	<i>DraI</i>	<i>TaqI</i>	Ap
Alelo		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Nº do haplótipo	Isolado										
68	30.7L	1	1	3	1	3	3	1	1	3	0
69	33.7L	0	0	0	0	0	0	1	1	3	0
70	933D2.E	1	1	2	0	0	0	0	0	0	0
	933D3										
71	941M	1	5	1	1	1	1	0	0	0	1
72	939F	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1
	941CO										
73	948F	1	5	1	1	1	1	1	1	1	0
74	941FA	1	1	2	1	1	1	1	1	3	1
75	941K	1	1	3	1	1	1	0	0	0	0
76	945E	1	3	1	1	1	1	0	0	0	0
77	972C	1	5	1	0	0	1	0	0	0	0
78	974C	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0