

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

**CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Bacillus*
thuringiensis PATOGÊNICOS À *Spodoptera frugiperda*
(LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**

Lucília Macedo Mandú Tremiliosi

Orientador: Prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas).

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL.

Julho de 2006

Tremiliosi, Lucília Macedo Mandú
T789c Caracterização de isolados de *Bacillus thuringiensis* patogênicos
à *Spodoptera frugiperda* (Lepdoptera: Noctuidae) / Lucília Macedo
Mandú Tremiliosi. – – Jaboticabal, 2006
iv, 61f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2006
Orientador: Manoel Victor Franco Lemos
Banca examinadora: Lúcia Maria Carareto Alve, Ricardo Antonio
Polanczyk
Bibliografia

1. Antibióticos. 2. Genes *cry*. 3. Perfil plasmidial. I. Título. II.
Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 631.52:632.937

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

LUCÍLIA MACEDO MANDÚ TREMILIOSI –

nascida em 19 de outubro de 1974, em Nova Londrina - PR, habilitada em Ciências Biológicas, formada pelo Centro Universitário Barão de Mauá, Ribeirão Preto – SP, em 28 de janeiro de 2000. Especializada no curso intitulado “As Células, o Genoma e Você Professor”, Departamento de Clínica Médica da FMRP-USP, Ribeirão Preto – SP e atuou como professora no ensino fundamental e médio das escolas públicas e particulares de 2000 a 2004.

A **Deus** por estar sempre ao meu lado, fazendo com que eu aprendesse com os meus erros e nunca desistisse de meus ideais.

Aos meus queridos pais, **Felisberto Mendes Mandú e Olinda Macedo Mandú**, por estarem sempre ao meu lado prontificando apoio, carinho, compreensão, paciência e prece, amo vocês.

DEDICO

Ao meu esposo e grande amor, **Germano Tremiliosi Neto**, que foi paciente, compreensivo e dedicado, demonstrando sempre seu amor em todos os momentos de nossas vidas, principalmente durante este trabalho, te amo.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos, meu agradecimento especial pela orientação durante a realização deste trabalho e por ajudar no meu desenvolvimento como pesquisadora e professora. Muito obrigada pelo seu profissionalismo, paciência e dedicação nos momentos difíceis.

À Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério Sena, pelos conselhos, profissionalismo e amizade.

Ao Prof. Dr. Ricardo Antonio Polanczyk pela realização dos experimentos de bioensaios na Universidade Federal do Espírito Santo.

À Eliane Cristina da Cunha Alves pelo apoio durante a condução dos experimentos, profissionalismo e amizade.

Aos membros da banca examinadora de qualificação, Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério Sena e Prof. Dr. Odair José Fernandes, obrigada pelas contribuições enriquecedoras na elaboração desta dissertação.

Aos membros da banca examinadora de defesa, Prof. Dra. Lúcia Maria Carareto Alves e Prof. Dr. Ricardo Antonio Polanczyk por suas contribuições valiosas neste trabalho.

Aos meus irmãos Donizete, Haroldo, Antônio, Carlos e Elizabeth que sempre me alegraram, me apoiaram e nunca me deixaram esquecer que uma família unida é a melhor coisa do mundo.

À minha irmã Eliete e seu esposo Tadeu por toda forma de ajuda, compreensão e carinho.

A todos de minha família, sobrinhos e cunhados que sempre me incentivaram e me deram muito carinho.

À minha segunda Família Tremiliosi: Germano Tremiliosi Filho, Gabriel, Guilherme, Gustavo, Carmem, Érica, Renato e Bia, pela força e carinho, principalmente a Elza E. S. C. Tremiliosi pela ajuda e incentivo.

À Marta de Campos Neves (Martinha), pessoa fundamental neste trabalho e também a pessoa mais otimista que já conheci. Obrigada pela amizade, preocupação comigo e com o trabalho e também pela disposição, paciência, idéias, incentivo constante e companhia nos cafés com bolachinhas.

À Viviane Cristina Vieira (Vi), pessoa admirável, sempre companheira, prestativa e disposta. Obrigada pela contribuição valiosa neste trabalho, amizade, palavras de incentivo, caronas, bolos, enfim, por tudo.

À Juliana Regina Vieira da Costa (Jú), pessoa adorável e generosa, amiga que esteve sempre presente, me transmitindo serenidade e força, além de apoiar-me nos trabalhos burocráticos.

À Vivian B. Bergamasco, que se mostrou uma grande amiga, tanto no trabalho quanto na república, otimista e disposta a ajudar.

À Ana Maria, Simone e Irlan, pelas idéias, sugestões e discussões sobre o trabalho e amizade.

A Máila Azol pela amizade, receptividade e incentivo principalmente no início do mestrado.

A Elaine Cícero pelas palavras de conforto, atenção incondicional e amizade.

Aos colegas do LGBBA, Juliana Rossi, Paula, Sandrinha, Janaína, Juliana Cordeiro, Matheus, Fernanda, Paulo, Larissa, Camila Fernandes, Camila Davolos, Natália e Cássia, pela amizade, incentivo, preocupação com o trabalho e momentos de alegria.

Ao Nei André e Alessandra Sverzuti por me apresentar à Unesp e por participarem de momentos importantes de minha vida.

À Márcia Regina, pelas conversas, discussões sobre o trabalho, receptividade em sua casa e amizade.

Ao Franco, por contribuir no início do mestrado, amizade e incentivo.

Ao João e a Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos por emprestar o laboratório e materiais para realização de práticas do experimento.

A todos os funcionários do Departamento de Biologia, em especial ao Aldo e a Lucinda, pela amizade e ajuda.

Ao Departamento de Biologia, por ceder o espaço físico e infra-estrutura para realização dos experimentos.

Ao CNPq pela concessão da bolsa.

Ao coordenador do curso de Pós-Graduação em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas), Prof. Dr. Rinaldo César de Paula, pela compreensão e colaboração.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Câmpus de Jaboticabal e a todos os professores que participaram de minha formação, agradeço.

SUMÁRIO

RESUMO.....	iii
SUMMARY.....	iv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. <i>Bacillus thuringiensis</i>	4
2.2. Perfis plasmidiais na espécie <i>Bacillus thuringiensis</i>	6
2.3. Resistência de bactérias a antimicrobianos.....	8
2.4. Utilização de marcadores moleculares do tipo PCR-RAPD.....	10
2.5. <i>Spodoptera frugiperda</i>	12
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1. Linhagens e isolados de <i>B. thuringiensis</i>	17
3.2. Procedimentos para o cultivo de isolados e linhagens de <i>B. thuringiensis</i>	18
3.2.1 Recuperação e armazenamento das linhagens cedidas pelo “Bacillus Stock Center”.....	18
3.2.2. Cultivo dos isolados e linhagens de <i>B. thuringiensis</i>	19
3.3. Extração do DNA genômico.....	20
3.4. PCR com iniciadores específicos da subclasse do gene <i>cry1A</i>	20
3.5. Quantificação do DNA.....	22
3.6. Reação de amplificação de genes <i>cry</i> específicos.....	22
3.7. Marcador molecular do tipo RAPD.....	23
3.7.1. Análise de polimorfismo por marcadores RAPD.....	23
3.7.2. Separação do material genético por ultracentrifugação.....	25
3.8. Reação de restrição dos DNAs plasmidiais e cromossomais.....	26
3.9 Determinação dos perfis plasmidiais e análise cromossômica dos isolados de <i>B. thuringiensis</i>	27
3.10. Determinação da resistência e susceptibilidade de <i>B.</i>	

<i>thuringiensis</i> frente a antibióticos.....	27
3.10.1. Preparação do meio de cultura com os antibióticos.....	27
3.10.2. Avaliação de resistência e susceptibilidade.....	28
3.11. Bioensaios contra <i>Spodoptera frugiperda</i>	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
4.1 Amplificação das regiões conservadas e não conservadas das subclasses do gene <i>cry1A</i>	31
4.2 Separação do material genético por ultracentrifugação.....	35
4.3 Análise do perfil plasmidial e caracterização cromossomal.....	37
4.4 Determinação de susceptibilidade e resistência de <i>B. thuringiensis</i> aos antibióticos.....	38
4.5 Análise por RAPD-PCR.....	41
4.6 Bioensaios efetivos a <i>Spodoptera frugiperda</i>	45
5. CONCLUSÕES.....	47
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48

CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Bacillus thuringiensis* PATOGÊNICOS À *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

RESUMO -

Bacillus thuringiensis durante sua fase de esporulação produz proteínas cristal, codificadas pelos genes *cry*, podendo atingir pragas de diversas ordens. Esta bactéria é utilizada no controle de pragas como a *Spodoptera frugiperda*, causadora de sérios prejuízos na agricultura. O objetivo desta pesquisa foi caracterizar os isolados MT6, MT7, SP8, SP6, PR2 e as linhagens H D73 e CRY-B de *B. thuringiensis* visando o controle de *S. frugiperda*. Foi utilizada a técnica de PCR que permitiu a identificação das subclasses do gene *cry1A* (Aa, Ab, Ac e Ae). O RAPD determinou similaridade entre todos os isolados e linhagens e somente a subsp. CRY(-)B apresentou 50 % de similaridade em relação às demais. Evidenciaram-se dois perfis diferentes entre todos e a B ausência plasmidial na subsp. CRY(-). A resistência e susceptibilidade aos antibióticos estreptomicina, canamicina, rifampicina e eritromicina, nas concentrações de 40, 60, 80, 100 e 120 ug/ml, permitiu constatar que somente a linhagem CRY(-)B apresentou resistência para rifampicina. Todos os isolados e linhagens foram resistentes a canamicina e susceptíveis a eritromicina e para estreptomicina todos foram resistentes em concentração variadas. Nos bioensaios os isolados MT6, MT7, PR2, SP6, SP8 e a linhagem HD73, demonstraram potencial no controle de lagartas de primeiro ínstar de *S. frugiperda*.

Palavras-Chave: antibióticos, genes *cry*, perfil plasmidial, RAPD

***Bacillus thuringiensis* ISOLATES CHARACTERIZATION PATHOGENIC TO
Spodoptera frugiperda (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**

SUMMARY -

Bacillus thuringiensis is an entomopathogenic bacteria that during sporulation produces crystal proteins, coded by *cry* genes, able to act on a great number of organisms. Such bacteria is used to control agronomic pests such as *Spodoptera frugiperda*, the causal agent of serious problems on the agroindustry. The aim of the present work was to characterize the isolates MT6, MT7, SP8, SP6, PR2 and the strains of the bacterium *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 e CRY(-)B aiming the control of *S. frugiperda*. The RAPD have determined 90% of similarity among the isolates and the strain CRY (-)B presented 50% similarity with the other ones. The plasmid profiles analyses has revealed similarities among the isolates SP6, SP8, MT6 and MT8 and differences between this strain HD-73 and isolate PR2. The MICs were conducted with the antibiotics streptomycin, kanamycin, rifampicin and erythromycin on the following concentrations 40, 60, 80, 100 and 120 ug/ml. Only the strain CRY(-)B has presented resistance to rifampicin. The bioassays results have shown that the MT6, MT7, SP8, SP6, PR2 isolates and the HD-73 exhibited 100 % efficiency for the biological control of *S. frugiperda* larvae.

Key-words: antibiotics, cry genes, plasmid profile, RAPD

1. Introdução

Dentre os organismos empregados no controle biológico, o *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) destaca-se por ser um organismo que durante sua fase de esporulação produz inclusões cristalinas (proteínas cristal), que são responsáveis pela atividade entomopatogênica de algumas linhagens pela qual a espécie é conhecida. As proteínas cristal ou δ -endotoxinas são codificadas por genes denominados *cry*, e podem ser patogênicas aos insetos das ordens Lepidoptera, Díptera e Coleoptera, ordem Acari e filo Nematoda.

O controle biológico através de *B. thuringiensis* vem sendo empregado em busca de uma forma mais eficaz de controle sobre os diversos tipos de pragas, visando minimizar ou até mesmo substituir o controle químico, por não ser tóxico aos humanos, a fauna, a flora, por não se poluente aos ecossistemas e não atingir os inimigos naturais dos insetos alvos devido à especificidade dos genes *cry*.

Esses fatos propiciaram estudos na identificação dos genes *cry* e a caracterização de isolados de *B. thuringiensis*, pois a patogenicidade e a especificidade de uma linhagem são determinadas pelos tipos de genes *cry* funcionais que a mesma possui, aliado ao fato desses evidenciarem alto grau de variabilidade genética para esta espécie.

Existem vários tipos de classes e subclasses dos genes *cry*, sendo que atualmente os genes já caracterizados e catalogados, bem como as linhagens consideradas padrões de *B. thuringiensis*, da qual um determinado gene foi originalmente identificado, podem ser encontrados nos sites: http://epunix.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/index e <http://www.bgsc.org/>, “Bacillus Stock Center”, Ohio State University, sendo os mesmos constantemente atualizados.

Avanços recentes na biologia molecular permitiram o desenvolvimento de técnicas capazes de caracterizar os isolados *B. thuringiensis*. Técnica como a PCR (MULLIS & FALOONA, 1987), tornou-se essencial na identificação dos genes *cry*, na

caracterização de isolados pouco conhecidos e indicando a especificidade de cada gene para uma determinada ordem de insetos - pragas (CAROZZI et al., 1991; BRAVO et al., 1998; PORCAR & JUAREZ-PEREZ, 2003). Estudos realizados através de análises de perfis plasmidiais e pela técnica de RAPD-PCR demonstraram informações importantes na caracterização de isolados de *B. thuringiensis*. Pesquisas utilizando antimicrobianos associados a técnica de PCR, também demonstraram eficiência na caracterização e identificação de novos isolados de *B. thuringiensis*. Estes estudos colaboram no desenvolvimento de bioinseticidas à base deste patógeno no Brasil e em todo mundo, efetivos no controle de muitas pragas, principalmente de *Spodoptera frugiperda*, (Lepidoptera: Noctuidae) praga que atinge diversas culturas.

A busca pelo desenvolvimento de um controle biológico eficiente e seguro, não somente para *S. frugiperda*, mas para outras pragas, é fundamental devido ao uso inadequado de inseticidas químicos. A utilização dos inseticidas químicos tem causado nos últimos anos um desequilíbrio nos ecossistemas por poluírem o meio ambiente, atuarem sobre os inimigos naturais dos insetos-pragas e promoverem o surgimento de populações de insetos-pragas resistentes. Além dessas conseqüências, este tipo de controle, muitas vezes, não possuem eficácia desejada e apresentam um alto custo, pois são necessárias várias aplicações para apresentarem o resultado desejado.

Dentre os muitos insetos pragas estudadas com a finalidade de serem controlados com a utilização de *B. thuringiensis*, a lagarta-do-cartucho destaca-se como fonte de estudo de muitos centros de pesquisas por causar danos a culturas importantes, como algodão, amendoim, arroz, batata, cana-de-açúcar, hortaliças, soja, trigo e o milho. No Brasil *S. frugiperda* é a principal praga da cultura do milho (CRUZ, 1995; GRÜTZMACHER et al., 2000; GALLO et al., 2002) podendo reduzir sua produção em até 34%, dependendo do estágio de desenvolvimento da planta (Carvalho 1970, Cruz et al. 1996). Pesquisas com *B. thuringiensis* mostraram excelentes resultados no controle desta praga, relatando altos índices de mortalidade quando utilizado isolados que apresentam as classes e subclasses do gene *cry1*, o qual também é eficiente para outros insetos da Ordem Lepidoptera (PRAÇA et al., 2004; POLANCZYK, 2004; CAVALEIRO et al., 2005).

Este trabalho teve por finalidade a caracterização de isolados de *B. thuringiensis* por meio de técnicas moleculares, microbiológicas, e bioensaios de patogenicidade visando o controle biológico de *S. frugiperda*.

2. Revisão de Literatura

2.1. *Bacillus thuringiensis*

B. thuringiensis é uma bactéria Gram-positiva, aeróbia facultativa, quimioheterotrófica, cuja temperatura ideal de crescimento é 30° C. Possuem forma de bastonete e quando em condições específicas, em geral desfavoráveis ao seu crescimento, desenvolvem um ciclo de esporulação típico dos bacilos.

No início de sua esporulação são sintetizadas grandes quantidades de proteínas que possuem atividade inseticida. As proteínas acumuladas formam um corpo de inclusão cristalina, razão pela qual elas são denominadas Cry (YAMAMOTO & DEAN, 2000). Esta inclusão protéica é o fator que caracteriza a espécie de *B. thuringiensis* e confere a muitas linhagens a característica entomopatogênica (Figura 1).

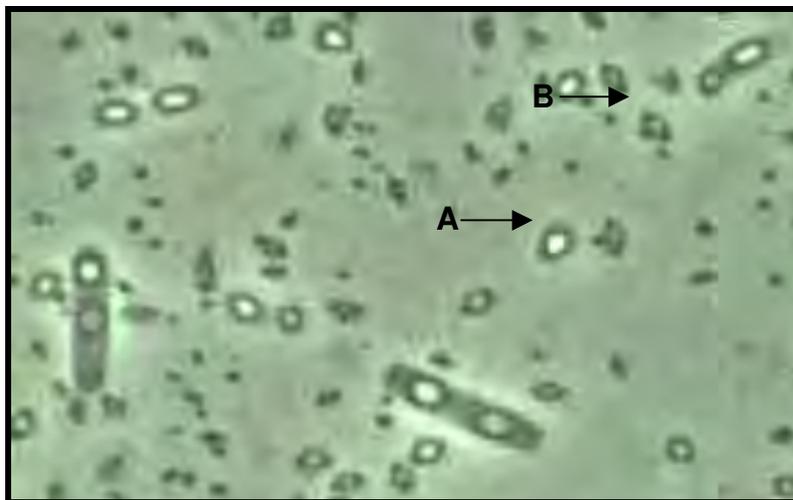


Figura 1. Foto de microscopia de contraste de fase de *Bacillus thuringiensis* em fase de esporulação. (A) indica o esporo e (B) o cristal.

Quando ocorre a ingestão dos esporos e cristais pelos insetos, os cristais são solubilizados em pH alcalino, originando as protoxinas que em presença de enzimas

digestivas (proteínases) são convertidas em quatro ou mais polipeptídios tóxicos (α-endotoxinas). Essas toxinas hidrolisadas atravessam a membrana peritrófica, ligam-se a receptores específicos localizados na membrana apical das células colunares do intestino médio do inseto, interferindo no gradiente iônico e no balanço osmótico da membrana apical formando poros que aumentam a permeabilidade da membrana. O aumento na absorção de água causa lise celular e eventual ruptura e desintegração das células do intestino médio.

De acordo com KNOWLES (1994), o intestino dos insetos suscetíveis geralmente possui um pH elevado, o que evita a germinação dos esporos ingeridos do patógeno. Porém as α-endotoxinas causam paralisia intestinal, retendo os esporos e destruindo a parede do intestino. O conteúdo intestinal mistura-se ao da hemolinfa, reduzindo seu pH e disponibilizando nutrientes necessários para iniciar a germinação dos esporos. O inseto morto serve então como fonte de nutrientes para o crescimento vegetativo da bactéria.

O inseto também pode morrer por inanição, uma vez que pouco tempo após a infecção o inseto cessa a alimentação (COPPING & MENN, 2000).

COPPING & MENN (2000), ressaltam que diferentes toxinas ligam-se à diferentes receptores em diversas espécies de insetos e com intensidade variada, o que explica a especificidade em diversas espécies de insetos.

A expressão das toxinas é regulada por dois mecanismos: o primeiro é dependente de fatores sigma específicos da fase de esporulação, onde está baseada a classificação da maioria dos genes *cry*, e outro independente do processo de esporulação, como o gene *vip3*, cujos fatores são típicos da fase de crescimento vegetativo (VALADARES-INGLIS et al., 1998).

A patogenicidade e a especificidade de uma linhagem são determinadas pelos tipos de genes *cry* funcionais que a mesma possui, como por exemplo, o gene *cry1A* tem sua especificidade voltada para Lepidópteros, o gene *cry11B* para Dípteros, e o gene *cry8A* para Coleópteros, entretanto a mesma bactéria pode conter mais do que um tipo de gene *cry*, e pode ser efetiva no controle de mais de uma ordem de insetos.

Os genes *cry* podem estar localizados no cromossomo, nos plasmídios ou em

ambos, porém algumas linhagens apresentam esses genes somente em plasmídios, como por exemplo, a subespécie *kurstaki* HD73 (LERECLUS et al., 1993) que contém o gene *cry1Ac* localizado em um único plasmídio de 50 MDa. Na variedade *israelensis* também foram encontrados cinco genes, sendo quatro codificadores de δ -endotoxina e um gene que codificador de citolisina, todos localizados em um único plasmídio de 72 MDa (BOURGOUIN et al. 1988).

Várias cepas de *B. thuringiensis* também produzem outras endotoxinas, de menor peso molecular (25-28KDa), denominadas de endotoxinas citolíticas (Cyt). Diferente das δ -endotoxinas, as Cyt possuem um maior espectro de ação contra insetos, tanto *in vivo* como *in vitro*. Os genes que codificam estas toxinas estão contidos em plasmídios grandes com 125 kb, que também contêm genes que codificam as toxinas Cry (GLARE & O'CALLAGHAM, 2000).

B. thuringiensis pode produzir outra toxina chamada δ -exotoxina, também denominada thuringiensina. Esta toxina possui atividade inseticida que abrange um grande número de insetos, porém como é tóxica para os vertebrados, a maioria dos bioinseticidas à base de *B. thuringiensis* utiliza subespécies que não produzem a δ -exotoxina.

Recentemente foi descoberta uma nova classe de toxinas, denominadas VIPs ou proteínas vegetativas, com elevada toxicidade para lepidópteros, incluindo a *S. frugiperda* (GLARE & O'CALLAGHAM, 2000).

A caracterização dos tipos de toxinas produzidas por *B. thuringiensis* é de grande relevância, pois nos leva ao entendimento da função e distribuição de seus genes, sua importância ao meio ambiente, e sua utilização no controle de insetos pragas.

2.2 Perfis plasmidiais na espécie *Bacillus thuringiensis*

Uma característica comum entre muitas subespécies de *B. thuringiensis* é a presença de um complexo arranjo de plasmídios, local onde se encontra muitos genes *cry*, embora existe linhagens de *B. thuringiensis* que são ausentes dos mesmos.

Os plasmídios são fragmentos de DNA circulares capazes de se multiplicar independentemente do cromossomo da célula hospedeira. Na prática, a diferença é que o DNA cromossômico é relativamente estável enquanto que o DNA plasmidial é facilmente transportável de uma linhagem para outra, permitindo uma transferência em conjunto de genes de resistência (KONEMAN et al., 1997).

Os genes que codificam as proteínas 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), cuja dispersão provavelmente ocorre no habitat deste microrganismo. Entretanto, os plasmídios de *B. thuringiensis* parecem estar em constante evolução devido à conjugação entre diferentes linhagens, sendo bem determinada tanto em laboratório (GONZÁLEZ et al., 1981), em insetos (JARRET & STEPHENSON, 1990; VILAS-BÔAS et al. 1998) quanto em solo esterilizado (VILAS-BÔAS et al., 2000; THOMAS et al. 2001). Portanto, devido a essas características, muitos isolados podem apresentar diferentes plasmídios com diferentes genes *cry*, determinando vários tipos de perfis plasmidiais, aumentando assim, o grau de heterogeneidade genética da espécie.

Sendo esses fatos relevantes, deve-se considerar a manutenção de determinados plasmídios, bem como sua estabilidade, persistência e multiplicação dentro das células hospedeira, principalmente durante sua fase de reprodução. Segundo VILAS-BÔAS (2004), estudos de perfis plasmidiais de linhagens isoladas de diferentes áreas geográficas indicaram grande variabilidade genética, porém, alguns isolados demonstraram perfis plasmidiais semelhantes, inferindo a necessidade de testes para descobrir se são ou não clones, apesar da grande distância geográfica.

A transferência de plasmídios em bactérias da mesma espécie no meio ambiente é um processo comum, no entanto, REDDY et al. (1987), demonstraram a distribuição de plasmídios de baixo peso molecular em linhagens receptoras de *B. thuringiensis*, *B. cereus* ou *B. anthracis*, onde se observou a existência de linhagens doadoras de um plasmídios de alto peso molecular, responsável pelas transferências dos plasmídios

pequenos.

Entre vários meios de caracterização de *B. thuringiensis*, o estudo do perfil plasmidial associado à técnica de RAPD-PCR demonstraram informações importantes de muitos isolados quando utilizado essas técnicas (VILAS-BÔAS & LEMOS, 2004). O perfil plasmidial tornou-se importante como princípio para outras pesquisas como: conjugação, eletroporação, seqüenciamento, clonagem, dentre outras.

Como padronização, em 1976 foi proposta a nomeação dos plasmídios (NOVICK et al., 1976), ainda bem aceita atualmente, consistindo em identificá-los com a letra p (plasmídio) seguida das iniciais dos pesquisadores que o estudaram ou do laboratório que ele foi identificado, seguido por um número de identificação.

2.3. Resistência de bactérias a antimicrobianos

A resistência aos antimicrobianos é um fenômeno genético, relacionado à existência de genes contidos no microrganismo, que codificam diferentes mecanismos bioquímicos que impedem a ação das drogas. A resistência pode ser originada de mutações que ocorrem nos microrganismos durante sua multiplicação, que resultaram de erros de cópia na seqüência de bases que formam o DNA, responsável pelo código genético (SAUNDERS, 1984).

Os mecanismos de resistência das bactérias envolvem alguns conceitos importantes. Resistência simples, por exemplo, é uma denominação usada para microrganismos que são resistentes a um único tipo de droga, já a resistência múltipla significa resistência simultânea a dois ou mais antibióticos. Resistência cruzada é o termo utilizado quando o mecanismo bioquímico de resistência a uma droga é o mesmo que para outras (TAVARES, 1996).

Os genes que codificam a resistência aos antibióticos podem estar localizados no cromossomo ou em elementos extracromossômicos, como por exemplo, os plasmídios. A transferência de marcadores de resistência, plasmidiais ou cromossômicos, entre bactérias, pode ocorrer através de três mecanismos de

recombinação gênica conhecidos: transformação, transdução e conjugação. Os transposons são fatores de transferência adicionais que ajudam os plasmídios a transportarem os genes de resistência de um organismo a outro. Estes elementos genéticos podem carregar porções dos plasmídios ou do DNA cromossômico (KONEMAN et al., 1997).

A sensibilidade dos microrganismos à ação das drogas antimicrobianas pode ser determinada *in vitro* por meio do antibiograma. O teste pode ser utilizado para a verificação do efeito bactericida ou bacteriostático, bem como para a demonstração das drogas que exercem estes efeitos. O antibiograma consiste no cultivo dos microrganismos, cuja sensibilidade se quer avaliar na presença de um ou vários antibióticos, verificando a ausência ou não de desenvolvimento do microrganismo no meio onde estão presentes as drogas ativas (GOULD, 1960; FAVA NETTO, 1975; WASHINGTON II, 1984; TRABULSI, 1991).

O antibiograma pode ser qualitativo (método de difusão) ou quantitativo (método de diluição) (GOUD, 1960; PETERSDORF & PLORDE, 1963; PETERSDORF & SHERRIS, 1965; CUNHA et al., 1969; SUTTER et al., 1972; GAVAN, 1974; SUASSUNA, 1974; ROSENBLATT, 1983).

Em *B. thuringiensis*, além dos genes *cry*, são encontrados com freqüência genes que conferem resistência à antibióticos, característica importante nos estudos de caracterização, isolamento, conjugação, estabilidade e expressão. Nos estudos de conjugação, quando o plasmídio conjugativo não contém genes de resistência, como é o caso do plasmídio conjugativo pHT73 que contém o gene *cry1Ac*, se torna necessário marcá-lo com o gene de resistência, para que o mesmo possa ser utilizado neste processo (HU, 2004).

O uso de antimicrobianos em *B. thuringiensis* associado a outras técnicas como microscopia óptica, são ferramentas importantes no isolamento e caracterização deste bacilo quando encontrado junto a outras espécies de bactérias como o *Bacillus sphaericus* (CAVALEIRO, 2005).

2.4 Utilização de marcadores moleculares do tipo PCR-RAPD

A técnica chamada de RAPD (DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso) trata-se, segundo FERREIRA & GRATTAPAGLIA (1995), basicamente de uma variação da técnica de PCR. A tecnologia da reação de polimerase em cadeia (PCR) foi desenvolvida por Kary Mullis, em meados da década de 80 (MULLIS & FALOONA, 1987; MULLIS, 1990), consistindo em um método simples para amplificar exponencialmente uma determinada seqüência de ácido nucléico, mediante a síntese de DNA *in vitro*. Os três passos essenciais em uma PCR, incluem: 1) desnaturação do DNA a amplificar; 2) hibridação dos dois oligonucleotídeos iniciadores (pequenas moléculas de DNA de fita simples) a cada uma das cadeias de DNA desnaturado; e 3) extensão dos oligonucleotídeos iniciadores mediante uma DNA polimerase estável (DUCASSE, 1999).

A identificação dos genes *cry* em linhagens de *B. thuringiensis* é feita ultimamente através do emprego das reações de PCR, com diferentes pares de oligonucleotídeos iniciadores, selecionados a partir de regiões conservadas e também de regiões não conservadas, dos diferentes grupos de genes *cry*, os quais são identificados segundo as diferenças de tamanho dos produtos amplificados. Os oligonucleotídeos iniciadores são sintetizados artificialmente de maneira que suas seqüências de nucleotídeos sejam complementares a seqüências específicas que flanqueiam a região alvo (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Dentre diversos estudos com marcadores moleculares, o uso do RAPD é bastante difundido e suas aplicações são amplas, como: construção de mapas genômicos, análise da estrutura e diversidade genética em populações naturais, programas de melhoramento de animais e plantas, e clonagem de genes.

WILLIAMS et al. (1990) propuseram a utilização de “primers”, ou iniciadores, mais curtos e de seqüência arbitrária para conduzir a reação de amplificação de RAPD, eliminando a necessidade de conhecimento prévio de seqüência, como a técnica de PCR. Outra diferença entre a PCR e o RAPD é a utilização de apenas um “primer” ao invés de um par de “primers”.

Para que haja amplificação de um fragmento RAPD no genoma analisado, são necessárias duas seqüências de DNA complementares ao “primer” arbitrário e estas devem estar suficientemente adjacentes (< 4000 pares de bases) e em orientação oposta, de maneira a permitir a amplificação exponencial de um segmento de DNA pela DNA polimerase (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995). Em seguida, os segmentos amplificados podem ser visualizados sob luz ultravioleta (devido a grande quantidade de DNA produzido) diretamente na forma de uma banda em um gel de eletroforese, geralmente de agarose corado com brometo de etídio. Cada “primer” arbitrário utilizado dirige a síntese de vários segmentos de DNA simultaneamente em diversos pontos do genoma, resultando em várias bandas no gel.

Os marcadores RAPD apresentam algumas vantagens em relação a outros métodos de análise do DNA. Por estar fundamentada na amplificação de DNA, essa técnica pode ser simples e rápida. Uma coleção de “primers” arbitrários viabiliza análises genômicas para qualquer indivíduo de várias espécies, eliminando a utilização de radioisótopos e dispensando o desenvolvimento de sondas específicas (WILLIAMS et al.,1990). Outra importante vantagem é a quantidade mínima de DNA necessária para análise genotípica de um indivíduo.

Segundo CLAEYS et al (2004), uma série de estudos tem obtido sucesso utilizando a técnica de RAPD para distinguir cepas de bactérias de diversas espécies.

Esta metodologia permite o acesso a informações acerca da biodiversidade em um grupo de isolados, no entanto, sua desvantagem é que não pode ser usada como um método de caracterização universal, como a sorotipagem, pois mesmo as menores variações nos procedimentos experimentais resultam em um padrão de bandas diferentes, limitando sua aplicação a apenas um único laboratório. Por este motivo, alguns estudos sobre variabilidade genética e caracterização de isolados de *B. thuringiensis*, tem utilizado a técnica de RAPD, associada a outros métodos, como perfis plasmidais, PCR, indicando assim, resultados mais concisos (VILAS BÔAS & LEMOS, 2004).

A análise de RAPD pode ser complementar a técnica de sorotipo flagelar usada para a caracterização genotípica de diferentes linhagens de *B. thuringiensis*

(PATTANAYAK et al., 2001).

HAZEM & MANAR (2003) utilizou a técnica de RAPD, análise morfológica, fisiológica, bioquímica e susceptibilidade antimicrobiana, para avaliar a taxonomia e a similaridade entre diferentes isolados de *Bacillus* termotolerantes.

A técnica de RAPD associada ou não a outras técnicas tem demonstrado eficiência nos estudos de similaridade genética de diversos organismos.

2.5. *Spodoptera frugiperda*

A lagarta-do-cartucho, *S. frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) foi reconhecida pela primeira vez em 1797, na Geórgia (EUA) por J. E. Smith. Este inseto possui ampla distribuição geográfica, ocorrendo desde a região central dos EUA até a Argentina e em algumas ilhas a oeste da Índia (BERTELS, 1970; PEDIGO, 1989) (Figura 2).

S. frugiperda é um inseto de metamorfose completa e os adultos, de hábito noturno, acasalam-se três dias após a emergência. As fêmeas podem colocar cerca de 1000 a 2000 ovos e as lagartas eclodem entre dois e três dias após a postura dos ovos (FERRAZ, 1982). Durante a fase larval o inseto pode apresentar de quatro a sete ínstares e a duração desta fase varia de 12 a 30 dias (PARRA & HADDAD, 1989). Ao completar o desenvolvimento a lagarta penetra no solo, onde se transforma em crisálida, no campo dura em média 11 dias (VALICENTE & CRUZ, 1991) e no laboratório a duração desta fase está entre 8 e 11 dias (SILVEIRA et al., 1997). Os adultos emergem a noite e apresentam acentuado dimorfismo sexual, com as asas anteriores de cor parda escura, e as posteriores, branco-acinzentada (CRUZ, 1995; FERRAZ, 1982).



Figura 2. *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae)

Dependendo do ínstar que a lagarta se encontra, sua presença na cultura de milho causa danificação nas folhas e dejetos no centro da planta. Quando as lagartas são recém-eclodidas atacam o milho no parênquima foliar de uma das faces da folha, deixando apenas uma epiderme membranosa, conferindo um aspecto transparente à folha e em instares mais adiantado os insetos passam a perfurá-las. Quando o ataque ocorre nos estágios iniciais da cultura, pode causar a morte das plantas. Pode também se dirigir para a região da espiga, atacando o pedúnculo e impedindo a formação de grãos. Pode ainda penetrar nas espigas na sua porção basal e danificar diretamente os grãos ou alimentar-se da ponta da espiga. Os danos mais severos são causados por lagartas de quinto e sexto ínstars (CARVALHO, 1982, CRUZ & TURPIN, 1982; WAQUIL et al., 1982; BIANCO, 1991; VALICENET & CRUZ, 1991).

A lagarta-do-cartucho é a principal praga da cultura do milho devido à sua ocorrência generalizada e ao seu potencial de ataque em todas as fases de desenvolvimento da planta, provocando quedas significativas no rendimento (CRUZ & TURPIN, 1982). Quando o ataque ocorre na fase inicial da cultura, essas perdas são

ainda mais significativas devido à morte das plântulas e à diminuição do número de plantas por unidade de área.

Este inseto é de difícil controle devido à sua ampla gama de hospedeiros e sua grande capacidade de dispersão durante o período de cultivo (KNIPLING, 1980). A lagarta-do-cartucho ataca também algodão, alfafa, amendoim, arroz, aveia, batata, batata doce, cana-de-açúcar, hortaliças, soja e trigo, porém, sendo mais comum em gramíneas.

Segundo alguns autores, o controle químico é ainda o mais utilizado para a lagarta-do-cartucho, atualmente o uso mais comum é dos inseticidas pertencentes ao grupo dos reguladores de crescimento, como o Lufenuron (GRÜTZMACHER et al., 2000), que atua na síntese de quitina, alterando o processo de ecdise (GALLO et al., 2002). Esses inseticidas possuem alta especificidade, além de apresentarem baixa toxicidade para mamíferos (SCHROEDER et al., 1976; SCHROEDER & SUTTON, 1978; GROSSCURT, 1978). Atuam também sobre os adultos, que se contaminam ao se alimentarem provocando esterilidade dos mesmos, e reduzindo sua fecundidade e afetando a viabilidade dos ovos (ÁVILA e NAKAMO, 1999).

Dentre as dificuldades de controle deste inseto, destacam-se a localização da lagarta-do-cartucho dentro do cartucho e a decisão do método de controle baseado nos sintomas externos das folhas perfuradas, os quais não comprovam a presença do inseto no interior do cartucho (GALLO et al., 2002; COOPLANTIO, 2003). Além disso, existem casos de relatos de evolução da resistência desta praga aos inseticidas químicos, (YU, 1992; DIEZ-RODRIGUES & OMOTO, 2001), mostrando que este tipo de controle apresenta também sérias limitações práticas.

Segundo CRUZ & BIANCO (2001), o controle com inseticidas via pulverização torna-se pouco efetivo em plântulas devido a reduzida área foliar, dificultando a retenção do produto nas folhas e diminuindo o seu poder de ação residual. A utilização de produtos sistêmicos via tratamento de sementes, nesse caso, tem-se constituído em alternativa viável.

Buscando um controle mais eficiente, não poluente e específico à *S. frugiperda*, iniciou-se estudos utilizando *B. thuringiensis*. Embora estudos iniciais foram considerados pouco eficientes no controle desta praga, atualmente no Brasil e em outros países, muitas pesquisas tem demonstrado o potencial do controle biológico através de *B. thuringiensis* (SALVADORI et al., 1986; VALICENTE et al., 1995; SILVA-WERNECK et al., 2000). A busca por novas linhagens, não apenas no controle de lepidópteros, mas no controle abrangendo um grande espectro de insetos – pragas de diferentes ordens estão sendo realizado por muitos centros de pesquisa.

A maioria dos produtos de *B. thuringiensis* usada para controlar lepidópteros-praga é baseada na mistura esporos-cristais, produzidos pela estirpe HD-1 de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, a qual tem amplo espectro de atividade larvicida dentro da Ordem Lepidoptera (NAVON, 1993).

Estudos que buscam a seleção de novos isolados de *B. thuringiensis* mais efetivos no controle desta praga são desenvolvidos principalmente através da identificação de genes *cry* e avaliação do modo de ação de suas toxinas (BOHOROVA et al., 1996; BRAVO et al., 1998; DIAS et al., 1999; SILVA-WERNECK et al., 2000; ARANGO et al., 2002). Segundo POLANCZYK et al (2000) várias linhagens de *B. thuringiensis* se mostram patogênicas em estudo com larvas de segundo ínstar de *S. frugiperda*.

Ao estudar 205 isolados de *B. thuringiensis* provenientes de diferentes regiões brasileiras no controle de *S. frugiperda*, SILVA-WERNECK et al. (2000), identificou apenas um isolado, denominado de S93, que causou 100% de mortalidade em larvas de terceiro estágio, demonstrando também ser mais tóxico do que a estirpe HD-1 de *Bt* subsp *kurstaki* isolado do produto Dipel. Este isolado foi sorologicamente caracterizado como *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (H3a: 3b), e também produziu cristais protéicos bipiramidais analisados pelo microscópio óptico sob contraste de fase e morfologia de cristais típicos de proteínas da classe *cry1*, as quais apresentam atividade contra lepidópteros (HÖFTE & WHITELEY, 1989).

Outros estudos buscam linhagens que atuam simultaneamente em diversas pragas, como nas pesquisas de PRAÇA et al. (2005), que demonstraram ao estudar

300 estirpes de *B. thuringiensis* que apenas dois isolados foram simultaneamente efetivos contra larvas de *S. frugiperda*, *Anticarsia gemmatalis*, *Anthonomus grandis*, *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*.

3. Material e Métodos

As análises moleculares foram realizadas no Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA), da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Campus de Jaboticabal. Os bioensaios foram conduzidos no Laboratório de Entomologia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo.

3.1. Linhagens e isolados de *Bacillus thuringiensis*

As linhagens de *B. thuringiensis* subsp. *Bt kurstaki* HD73 (código de acesso BSC - 4D4) e subsp. CRY(-)B (código de acesso BSC – 4D11) foram gentilmente cedidos pelo “Bacillus Stock Center” (BSC), Ohio State University, EUA e os isolados MT6, MT7, SP8, SP6 e PR2 foram provenientes da coleção de isolados de *B. thuringiensis* mantidas no LGBBA (Tabela 1). Foi utilizado como controle positivo no RAPD-PCR e Bioensaio a subsp. *Bt kurstaki* HD-1 (BSC - código do LGBBA - 16) e na reação de PCR os isolados BR6 e BR7 (Tabela 1) provinientes da coleção do LGBBA .

Os isolados MT6, MT7, SP8, SP6 e PR2 e a subsp. *Bt kurstaki* HD73, foram selecionados para este estudo por apresentarem o gene *cry1A*, um complexo arranjo plasmidial e uma possível ação patogênica contra insetos da Ordem Lepidoptera.

A subsp. CRY(-)B foi escolhida por ser acristalífera (STAHLEY et al., 1978), para que através da caracterização por técnicas atuais ampliar o conhecimento desta linhagem e verificar a possibilidade de se tornar um controle padrão para as técnicas utilizadas neste trabalho.

Tabela 1. Isolados provenientes da coleção do LGBBA.

Código LGBBA	Código Original	Local de isolamento	Estado	Região
542	PR2	Chapecó	PR	Sul
506	MT6	Cuiabá	MT	Centro Oeste
507	MT7	Cuiabá	MT	Centro Oeste
533	SP8	Águas de São Pedro	SP	Sudeste
532	SP6	Piracicaba	SP	Sudeste
67	BR6	Londrina	PR	Sul
68	BR7	Londrina	PR	Sul

3.2. Procedimentos para o cultivo de isolados e linhagens de *B. thuringiensis*

3.2.1 Recuperação e armazenamento das linhagens cedidas pelo “Bacillus Stock Center.”

As linhagens cedidas pelo “Bacillus Stock Center” estocadas em pequenos discos de papel foram depositadas em erlenmeyers de 250 ml contendo 50 ml de BHI líquido (Brain Heart Infusion Broth, contendo infusão de cérebro 12,5 g/L, infusão de coração 5 g/L, peptona 10g/L, glicose 2 g/L, cloreto de sódio 5g/L e fosfato disódico de hidrogênio 2,5 g/L) e agitados a 80 rpm (Orbital Shaker) a 30° C, por 12 h, para recuperação das linhagens. Após este processo, 100 µl de cada solução foram distribuídos em placas de Petri contendo Nutriente Ágar (extrato de carne 3,0 g/l; peptona de gelatina 5,0 g/l; ágar 15,0 g/l, pH 6.8), espalhadas com o auxílio de uma alça de Drigalsky esterilizada e incubadas em estufa a 30° C por um período de três a cinco dias para esporulação.

Após a esporulação, realizou-se uma análise por microscopia óptica através de um esfregaço das células bacterianas em lâminas, verificando a presença de cristais protéicos e de possíveis contaminantes.

A seguir, sobre as placas de Petri contendo os esporos/cristais adicionou-se 1 ml de água estéril, formando uma suspensão, onde foram imersas fitas de papel de filtro estéreis. As fitas de papel umedecidas foram colocadas para secar a temperatura ambiente e em seguida, estocadas em tubos criogênicos estéreis de 2 ml. Uma das fitas foi colocada em um tubo criogênico com 1ml de água estéril para ser utilizada como solução de trabalho.

3.2.2. Cultivo dos isolados e linhagens de *B. thuringiensis*

Para o cultivo das células bacterianas, uma pequena quantidade de células da solução de trabalho foi semeada com o auxílio de uma alça de platina estéril em placas de Petri contendo meio BHI sólido (Brain Heart Infusion Ágar, contendo infusão de cérebro 12,5 g/L, infusão de coração 5 g/L, peptona 10g/L, glicose 2 g/L, cloreto de sódio 5g/L, fosfato disódico de hidrogênio 2,5 g/L e 15,0 g/L de ágar) e incubadas a 30° C, por 12 h para o crescimento das bactérias. Após esse período, com uma alça de platina foi retirada uma pequena quantidade de células das placas e colocadas em erlenmeyers de 250ml contendo 50 ml de BHI líquido, incubadas sob a agitação de 200 rpm, a 30° C, durante 4h e 30 min, para multiplicação e renovação celular. Passado este tempo, a turbidez foi verificada em espectrofotômetro, utilizando-se comprimento de onda de 600 nm para a verificação dos valores de absorbância ideais para o cultivo de *B. thuringiensis* que estão estabelecidos entre 0.5 e 0.8.

Em seguida, os meios de cultura contendo as células foram colocados em tubos e centrifugados a 2.450 x g a 10° C por 15 min, para remoção do meio e obtenção de um “pellet” de células bacterianas.

3.3. Extração do DNA genômico

A extração do DNA genômico dos isolados e linhagens de *B. thuringiensis* foi realizada conforme o protocolo de MARMUR (1961).

Utilizou-se 0,5 g do “pellet” de células bacterianas obtidas anteriormente, onde foram ressuspensas em 6 ml de solução salina (0,15 M de NaCl e 0,1 M EDTA, pH 8.0). A lise das células foi obtida com a adição de 0,6 ml de lisozima (20 mg/ml) e incubação por 1 h e 30 min a 37° C. Posteriormente, as células foram submetidas novamente à lise com 0,5 ml de SDS 25%, seguida de suave agitação.

Para a precipitação do DNA utilizou-se 4,5 ml acetato de sódio 2,5 M, com agitação por 5 min. As desproteinizações foram feitas com a adição de 11,5 ml de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1v/v) seguidos de agitação por 5 min, em seguida o material foi centrifugado a 2.450 x g durante 15 min, a 4° C. Aos sobrenadantes adicionaram-se dois volumes de etanol absoluto gelado para precipitação de ácidos nucléicos. Tais amostras foram centrifugadas a 7.740 x g por 20 min a 4° C e os precipitados obtidos foram ressuspensos em 1 ml de tampão TE (50 mM Tris; 10 mM de EDTA pH 8.0). A seguir realizou-se tratamento com 25 µl de RNase (10 mg/ml) a 37° C, por 30 min.

Um novo tratamento com clorofórmio/álcool isoamílico (24:1 v/v) foi utilizado para a retirada da RNase, o qual foi seguido por outro tratamento com etanol absoluto para a precipitação do DNA e centrifugados, seguindo as mesmas condições descritas anteriormente. As amostras dos DNAs foram ressuspensas em 1 ml de TE, transferidas com o auxílio de uma pipeta para tubos de 1,5 ml e armazenados a -20° C, para serem utilizados como DNA estoque em todas as técnicas desenvolvidas neste trabalho.

3.4. PCR com iniciadores específicos das subclasses do gene *cry1A*

Os oligonucleotídeos iniciadores foram elaborados a partir das regiões conservadas das seqüências correspondentes a cada uma das subclasses do gene *cry1* para insetos da Ordem Lepidoptera, obedecendo à lista de nomenclaturas das δ -endotoxinas de *B. thuringiensis* disponíveis 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 algumas das subclasses *cry1* foram elaborados iniciadores também a partir de regiões não conservadas. A síntese dos oligonucleotídeos foi realizada pela *MWG (The Genomic Company)* e pela *Bio Synthesis (Oligo Data Sheet)*. Como controles positivos dessas seqüências foram utilizados os isolados denominados BR7 para a subclasse *cry1Ae* e BR6 para as demais subclasses, previamente caracterizados no LGBBA. As seqüências das regiões podem ser visualizadas na tabela 2.

Tabela 2. Seqüências dos iniciados referentes as subclasses do gene *cry1A*

Iniciadores	Tamanho do produto amplificado	Seqüências
Cry1Aa conservada	426 pb	F 5' TATTTCTTGTGCGCTAACGC 3' R 5' CCAAACACTGAAACATCTCTC 3'
Cry1Aa não conservada	1035 pb	F 5' TTCGCATCATTCTCCTTAG 3' R 5' CTGTCCACGATAAATGTTCC 3'
Cry1Ab conservada	799 pb	F 5' GAGATGTTTCAGTGTTTGGAC 3' R 5' GTCCCGTCAAGAACAGATAG 3'
Cry1Ab não conservada	640 pb	F 5' CGGGTAATCGCTCGTCTATC 3' R 5' CTTACTTCTCGCCATTATCC 3'
Cry1Ac conservada	712 pb	F 5' GGTGCTGGATTTGTGTTAGG 3' R 5' TTCTTTCTATGCCCTGAGCC 3'
Cry1Ac não conservada	656 pb	F 5' AACATTGGAGTGAAAGAAC 3' R 5' TTAATTCTCGCCATTATCC 3'
Cry1Ae conservada	838 pb	F 5' GCTCTTACAACCGCTATTCC 3' R 5' TATTATCCTGTGGTGGTATTTC 3'

3.5. Quantificação do DNA

As amostras de DNA extraídas foram quantificadas em espectrofotômetro modelo DU-640B (Beckman), diluídas na proporção de 2 µl da solução estoque de DNA em 98 µl de água esterilizada.

A quantificação por espectrofotometria foi feita para estimar a pureza do DNA pela razão entre as leituras feitas a 260 e 280 nm. Preparações puras de DNA têm valores para este coeficiente no intervalo de 1.8 a 2.0. Valores abaixo de 1.8 indicam contaminação do ácido nucléico com proteína (SAMBROOK et al., 1989). Para estimar a quantidade de DNA total foi utilizado um padrão em que a unidade de absorbância de 260 nm foi equivalente a 50 µg de DNA por ml de solução. A concentração final usada como solução de trabalho foi de 20 ng/µl.

Para análise da qualidade do DNA extraído foram feitas corridas em géis de agarose na concentração de 0,8% submetidos a eletroforese por 2 h a 70 V em cuba modelo 11-14 BRL horizontal, conduzida em tampão de corrida TEB - Tris-Borato-EDTA 1X (Tris 89 mM; H₃BO₃ 89 mM; EDTA 2,5 mM, pH 8.2) previamente diluído [100 ml de tampão TEB para 900ml de água estéril e 50µl brometo de etídeo (10 mg/ml)].

Para comparação do padrão das bandas foi usado o padrão de bandas “1kb Ladder” da GIBCO/BRL. Os fragmentos de DNA foram visualizados sob luz UV, documentados em um fotodocumentador modelo GEL DOC 2000 (Bio-Rad).

3.6. Reação de amplificação de genes *cry* específicos

As reações de amplificação foram realizadas em um volume de 20 µl, contendo: 2 µl de DNA (20ng); 0,5 µl de dNTPs (10 mM); 0,7 µl de MgCl₂ (1,75 mM); 0,3 µl de cada iniciadores (0,3 pmol de cada um); 0,3 µl da enzima *Taq* DNA polimerase (1,5U); 2 µl de tampão de PCR e 13,9 µl de água destilada Milli-Q estéril (q.s.p. 20 µl), como

controle negativo foi utilizada água Milli-Q em substituição ao DNA.

As amplificações ocorreram utilizando um termociclador (PTC-100 Programmable Thermal Controller – MJ Research, Inc.) equipado com circuito “Hot Bonnet” onde foi estabelecido o seguinte programa: 5 min a 95°C, seguido de 31 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 50°C, 1 min a 72°C, finalizando a 72°C por 5 min e posteriormente 13°C até a retirada dos tubos do termociclador.

As amostras foram visualizadas e analisadas em géis de agarose 1,5%, utilizando-se de 15 µl do produto da PCR e 3 µl de tampão de carregamento (Tris – HCl 0,1M, pH 6.8; azul de bromofenol a 0,02%; glicerol 50%). Os géis foram submetidos a eletroforese por 2 h a 70 V em cuba modelo 11-14 BRL horizontal, conduzida em tampão de corrida TEB - Tris-Borato-EDTA 1X (Tris 89 mM; H₃BO₃89 mM; EDTA 2,5 mM, pH 8.2) previamente diluído [100 ml de tampão TEB para 900ml de água estéril e 50µl brometo de etídeo (10 mg/ml)].

Os fragmentos amplificados obtidos foram comparados com fragmentos de DNA de tamanho molecular conhecido (1kb DNA Ladder), como referência de migração eletroforética para verificação dos tamanhos dos fragmentos. Os géis foram visualizados sob luz UV e documentados em fotodocumentador modelo GEL DOC 2000 (Bio-Rad).

3.7. Marcador molecular do tipo RAPD

3.7.1. Análise de polimorfismo por marcadores RAPD

As reações de amplificação das amostras de DNA para as análises de PCR-RAPD, foram realizadas segundo WILLIAMS et al. (1990).

Para estes ensaios de amplificação foram utilizadas as amostras de DNA dos isolados e das linhagens preparados anteriormente (item 3.2; 3.3 e 3.5). Foi empregado um conjunto de 21 oligonucleotídeos iniciadores (“primers”) de seqüências arbitrárias de 10 bases, provenientes da coleção da “University of British Columbia – Nucleic Acid – Protein Service Unit” (Canadá). Como controle positivo foi utilizado a linhagem de *B. thuringiensis* subsp. *Bt kurstaki* HD-1 e como controle negativo o DNA de planta para diferenciar o perfil de bandas entre bactérias e plantas. As respectivas seqüências dos iniciadores se encontram na Tabela 3.

Tabela 3. Seqüências arbitrárias dos iniciadores e respectivos números de acessos.

SEQÜÊNCIAS	
INICIADORES	
212	GCT GCG TGA C
230	CGT CGC CCA T
231	AGG GAG TTC C
232	CGG TGA CAT C
241	GCC CGA CGC G
252	CTG GTG ATG T
253	CCG TGC AGT A
254	CGC CCC CAT T
256	TGC AGT CGA A
264	TCC ACC GAG C
265	CAG CTG TTC A
268	AGG CCG CTT A
272	AGC GGG CCA A
275	CCG GGC AAG C
276	AGG ATC AAG C

As reações foram realizadas em um volume de 20 µl contendo: 1 µl de DNA (20 ng); 0,4 µl de dNTP (10 mM); 0,7 µl de MgCl₂ (1,75 mM); 3,0 µl de iniciador (5 ng); 0,4 µl de enzima *Taq* DNA polimerase (2 U); 2,0 µl de tampão de PCR e 12,5 µl de água destilada Milli-Q esteril (q.s.p. 20 µl). Como controle negativo foi utilizada água Milli-Q e

DNA de planta em substituição ao DNA e como controle positivo a subsp. *Bt kurstaki* HD-1. Para as amplificações utilizou-se o aparelho termociclador (MJ RESEARCH, Inc., modelo PTC-100 TM) equipado com circuito “Hot Bonnet”. O programa foi submetido às seguintes condições: 2 min a 94°C seguido de 34 ciclos de 1 min a 94°C, 2 min a 36°C, 2 min a 72°C, para finalização 72°C por 5 min e posteriormente 5°C até a retirada dos tubos do termociclador.

As amostras amplificadas foram analisadas em gel de agarose 1,5% utilizando-se do tampão de corrida (TBE) e 3 µl de tampão de carregamento. O tempo de corrida eletroforética foi de aproximadamente 2 h a uma tensão de 70 V. Os fragmentos amplificados pela PCR e separados por eletroforese foram comparados com aqueles do DNA de tamanho molecular conhecido (“1kb DNA Ladder”), visualizados sob luz UV e documentados em fotodocumentador modelo GEL DOC 2000 (Bio-Rad).

A análise do bandejamento produzido por cada oligonucleotídeo iniciador aleatório, foi feita conferindo o parâmetro 1 para a presença de banda, e zero para a ausência de banda, isso permitiu a elaboração de uma matriz binária que foi utilizada para a construção de um dendrograma pelo programa FREETREE versão 0.9.1.50 (HAMPL et al., 2001).

A matriz de similaridade foi construída utilizando o coeficiente de distância descrito por NEI (1986).

O dendrograma foi obtido por meio do método UPGMA (Unweighted Pair Group Method for Arithmetic Averages) (SNEATH & SOKAL, 1978) sendo sua visualização possibilitada pelo programa Treeview (PAGE, 1996) que permitiu o agrupamento dos isolados, de forma tanto mais similar quanto mais coincidentes foram os tamanhos dos fragmentos.

3.7.2. Separação do material genético por ultracentrifugação.

A separação do material genético (DNA cromossômico e plasmidial) foi realizada de acordo com SAMBROOK & RUSSEL (2001), utilizando-se uma ultracentrifuga Beckman modelo TL-100, equipada com um rotor Beckman modelo TLA -100.3.

Cada amostra foi preparada com 1500 ng de DNA, 2 g de CsCl (98%) e 160 µl de brometo de etídio (10 mg/ml), formando um volume de 2 ml para cada isolado. Cada preparação foi submetida à ultracentrifugação a 432.800 x g, por um período de 20 h a 20°C. As bandas referentes ao DNA cromossômico e DNA plasmidial foram visualizadas sob luz ultravioleta com o auxílio de óculos e placa de proteção UV, transferidas com o auxílio de uma pipeta de 1000 µl para tubos de 2 µl separadamente.

Para a remoção do brometo de etídio foram realizadas lavagens com dois volumes de butanol (butanol-1 saturado com água ou álcool isoamílico). Os tubos foram agitados suavemente e centrifugados por 3 min a 453 x g, por sucessivas vezes, até que a suspensão contendo o DNA se encontrasse livre de brometo.

A remoção do cloreto de céσιο foi feita com a adição de 2 volumes de etanol e 3 volumes de água estéril para cada amostra de DNA, que foi agitada suavemente e centrifugadas a 15294 x g por 15 min a 4°C para a recuperação dos DNAs. Em seguida, os cromossomos foram ressuspensos em 50 µl de tampão TE (50 mM Tris; 10 mM de EDTA pH 8.0) e os plasmídios em 30 µl do mesmo tampão.

3.8. Reação de restrição dos DNAs plasmidiais e cromossômicos

A reação de restrição foi realizada com a enzima *EcoRI*, que permitiu cortes coesivos nos segmentos de DNA plasmidial nas regiões palindrômicas: 5`...G•AATTC...3` e 3`...CTTAA•G...5`. A reação foi conduzida em um volume total de 12 µl, contendo: 0,3 µl de enzima de restrição *EcoRI* (10 U/µl); 1 µl de tampão para a enzima *EcoRI* [10X]; 7,7 µl água destilada Milli-Q e 3 µl de DNA (210 ng/µl) quando realizada para os plasmídios. Para a reação de restrição dos cromossomos utilizou-se a mesma reação mudando-se o DNA (1 µL com concentração de 250 ng/µl) e a água (9,7 µl). As reações foram incubadas a 37°C durante 2 h, em um termociclador PTC-100.

Após a restrição, foram adicionados 3 µl de tampão de amostra no volume total da reação e 10 µl das amostras foram aplicados em gel de agarose 1%, em tampão TEB, submetidos à eletroforese em corrente elétrica de 70 V por 2 h e visualizados pelo fotodocumentador.

3.9. Determinação dos perfis plasmidiais e análise cromossômica dos isolados de *B. thuringiensis*.

Para a obtenção do perfil das bandas plasmidiais, foi utilizado os DNAs plasmidiais separados pela ultracentrifugação. Para a preparação das amostras utilizou-se 10 µl de DNA plasmidial adicionado de 3 µl de tampão de amostra, sendo depositadas em gel 0,7% com agarose “Low Melting Point” [(0,7 g de agarose para 70 ml de tampão TAE 50X (2 M Tris-Acetato e 50 mM EDTA)] em tampão TAE preparado em cuba 11-14. Em seguida, as amostras foram submetidas a uma corrente elétrica de 24 V por 12 h, visualizadas e analisadas em fotodocumentador.

Os DNAs cromossômicos foram analisados com o objetivo de complementar técnica de perfil plasmidial, para isso foi utilizado 10 µl de DNA provenientes da diluição feita com 1 µl de DNA separado pela ultracentrifugação em 99 µl de água estéril, adicionado de 3 µl de tampão de amostra. As amostras foram depositadas em gel de agarose “Low Melting Point” 0,7%, em tampão TAE, preparado em cuba 11-14 e submetidas a uma corrente elétrica de 24 V por 12 h, visualizadas e analisadas em fotodocumentador.

3.10. Determinação da resistência e susceptibilidade de *B. thuringiensis* frente a antibióticos.

3.10.1. Preparação do meio de cultura com os antibióticos

Os antibióticos utilizados para esta análise foram estreptomicina, rifampicina, canamicina e eritromicina, sendo todos mantidos em concentração estoque de 100.000 µg/ml, diluídos em soluções apropriadas e utilizados nas concentrações de 40, 60, 80, 100 e 120 µg/ml. Os antibióticos foram adicionados ao meio de cultura BHI sólido no momento de seu plaqueamento, quando o mesmo ainda se encontrava em estado líquido, logo após sua esterilização em autoclave por 20 min. As preparações e concentrações dos antibióticos podem ser observadas na Tabela 4.

3.10.2. Avaliação de resistência e susceptibilidade

Os isolados MT6, MT7, SP8, SP6, PR2 e as subsp. *Bt kurstaki* HD73 e CRY(-)B foram cultivadas de acordo com o item 3.2.2 Após as células serem quantificadas em espectrofômetro DU 640B (Beckman) para verificação dos valores de D.O., iniciou-se o avaliação da resistência e susceptibilidade.

Tabela 4. Preparações dos Antibióticos.

Antibióticos	Concentração final	Diluição	Concentrações
Eritromicina	100.000 µg /ml	0,05g p/ 1ml de etanol	60, 80, 100, 120 e 150 µg/ml
Cloranfenicol	100.000 µg /ml	0,5g p/ 5 ml de água	60, 80, 100, 120 e 150 µg/ml
Rifampicina	100.000 µg /ml	0,01g p/ 1ml de etanol 95%	60, 80, 100, 120 e 150 µg/ml
Estreptomicina	100.000 µg /ml	0,5g p/ 5 ml de água	60, 80, 100, 120 e 150 µg/ml

Para esta avaliação, utilizou-se 100 µl de suspensão de cada isolado e linhagem crescida nos 50 ml de BHI líquido puro, esta foi distribuída em placas de Petri contendo o meio BHI sólido preparados com os antibióticos nas concentrações adequadas. Como controle positivo utilizou-se placas sem antibióticos e os testes foram realizados em duplicata para cada concentração. A suspensão foi espalhada na placa de Petri com alça de Drigalsky estéril até atingir uma distribuição uniforme e incubadas a 30° C por 48 h. Após este período, observou-se a presença ou não do crescimento bacteriano, determinando susceptibilidade e resistência das bactérias aos antibióticos. Este ensaio foi realizado duas vezes para confirmação da ausência de contaminantes

3.11. Bioensaios contra *Spodoptera frugiperda*

Os isolados MT6, MT7, SP8, SP6, PR2 e as linhagens CRY(-)B, HD73 e HD-1 foram semeadas em placas de Petri contendo meio de cultura Nutriente Agar (25 g/L de meio Nutrient Broth e 15 g/L de ágar Technical, pH 6.8, esterilizado por 30 min em autoclave à pressão de 1,5 Kgf/cm²), colocadas em estufa por 48 h, a 20° C para esporulação.

A suspensão formada nas placas foi analisada por microscopia óptica para a verificação dos esporos/cristais e de possíveis contaminantes.

Toda suspensão foi retirada das placas com o auxílio de uma alça de platina estéril e transferida para tubos Falcon (50 ml) contendo 20 ml de água estéril. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 1301 x g por 30 min para o descarte do sobrenadante. Esta operação foi repetida por três vezes para total eliminação do resto de meio de cultura e toxinas indesejáveis. O sedimento foi ressuspenso em 10 ml de água estéril e armazenado em condições controladas (5 ± 1° C, 70 ± 5%).

A concentração da suspensão de esporos/cristais foi estabelecida através da média de 3x10⁸ esporos/ml (BATISTA et al., 2005), para serem colocadas sobre a dieta

das lagartas.

As lagartas foram alimentadas com dieta artificial semi-sólida (BARRETO et al., 1999), constituída por: 123,60g de feijão carioca cozido foi colocado em um liquidificador juntamente com 3 ml de formol, solução inibidora (418ml de ácido propiônico, 42 ml de ácido fosfórico, 540 ml de água destilada) e 300 ml de água. Após a homogeneização foram adicionados 400 mL de água destilada fervida, juntamente com os ingredientes sólidos (59,30g de gérmen de trigo, 38g de levedura de cerveja, 3,82g ácido ascórbico e 2,36g de Nipagin), misturando-os durante 5 min. Em seguida foi colocado 15,35g de ágar previamente dissolvido em 300 ml de água fria, misturando por mais 3 min. A dieta foi colocada em forma de alumínio esterilizada, descansando no fluxo laminar até solidificar. Depois de cortada em cubos de 1 cm³, foi esterilizada em luz germicida no fluxo laminar e conservadas em geladeira.

Para a alimentação das lagartas cada cubo da dieta foi inserido em um copinho plástico, banhado com 1 ml de solução de esporos/cristais e colocado em um gerbox (2,0 X 6,0 cm), onde foram colocadas 10 larvas de primeiro instar de *S. frugiperda*.

O delineamento foi inteiramente casualizado, com nove tratamentos (SP6, PR2, SP8, MT6, MT7, HD73, CRY(-)B), subsp. *Kurstaki* HD1 como controle positivo, água destilada como testemunha e cinco repetições. Os tratamentos foram acondicionados em câmara climatizada ($25 \pm 1^{\circ}\text{C}$), fotofase (12 h) e umidade relativa ($70 \pm 5\%$).

Os tratamentos foram avaliados após cinco dias da inoculação com a quantificação das lagartas mortas pela ação das δ -endotoxinas produzidas pelos bacilos.

Para a análise estatística, os dados percentuais de mortalidade foram submetidos à análise de variância, cujo modelo matemático proposto inclui o efeito fixo de linhagens. Os testes de comparação de médias entre as linhagens foram realizados após verificação do efeito do grupo sobre a porcentagem de mortalidade. Para essa comparação de médias, foi utilizado o teste de Tukey a 5%, para estabelecer a diferença mínima significativa entre as médias de mortalidade desses isolados, pelo Sistema de Análise Estatística (SANEST).

4. Resultados e Discussão

4.1. Amplificação das regiões conservadas e não conservadas das subclasses do gene *cry1A*

Os iniciadores elaborados para a amplificação da região conservada das subclasses do gene *cry1A* (*cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac* e *cry1Ae*) foram gerados dentro da região conservada deste gene e determinaram que estas subclasses apresentaram-se em homologia. Na Figura 2 e 3, pode-se observar o alinhamento de todas as seqüências de cada subclasse da região conservada e não conservada do gene *cry1A* quando utilizado o *software Clustal W* (THOMPSON et al., 1994) e o *software Gene Runner 3.0* (Hastings Software, Inc.) para a geração das mesmas, sendo que apenas a subclasse *cry1Ae* não apresentou a região não conservada, pois encontra-se apenas uma seqüência deste gene no banco de dados.

Os iniciadores produzidos para as subclasses do gene *cry1A*, utilizados nas reações de PCR dos isolados HD73, MT6, MT7, SP8 e SP6, permitiram a amplificação de todas as subclasses do gene *cry1A* (*cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac* e *cry1Ae*) de ambas as regiões. Todos os resultados de amplificação podem ser observados na Figura 4.

A subsp. *Bt kurstaki* HD73, tal como descrito por LERECLUS et al. (1993) apresentou a subclasse do gene *cry1Ac*, possuindo este gene em um único plasmídeo de 50 MDa. Ao realizar amplificações com iniciadores para as demais subclasses do

gene *cry1* de ambas as regiões estudadas, foi constatada a presença de outras subclasses nesta linhagem.

O isolado PR2 não amplificou para a subclasse do gene *cry1Ae* da região conservada e nem para a subclasse *cry1Ac* da região não conservada, porém amplificou para demais regiões, confirmando a presença do gene *cry1A*.

A linhagem CRY(-)B não amplificou para nenhuma das subclasses do gene *cry1A*, resultado já esperado, pois STAHLEY et al. (1978), realizaram a identificação desta linhagem com sendo *B. thuringiensis* por detecção do antígeno flagelar e a descreveram como acristalífera.

A análise dos amplicons produzidos que envolvem as subclasses do gene *cry1A*, tendo como molde o material genético obtido dos isolados MT6, MT7, SP6, SP8, PR2, PR2 e a subsp. *kurstaki* *Bt* HD73, permitiu caracterizá-los quanto a presença das subclasses do genes *cry1A* , relatando através das mesmas a presença deste gene.

Como os produtos de amplificação foram semelhantes nos isolados, sugere-se um estudo de outras classes e subclasses do gene *cry1* , ao até mesmo de outros genes *cry*, para verificar a existência de maior variabilidade genética.

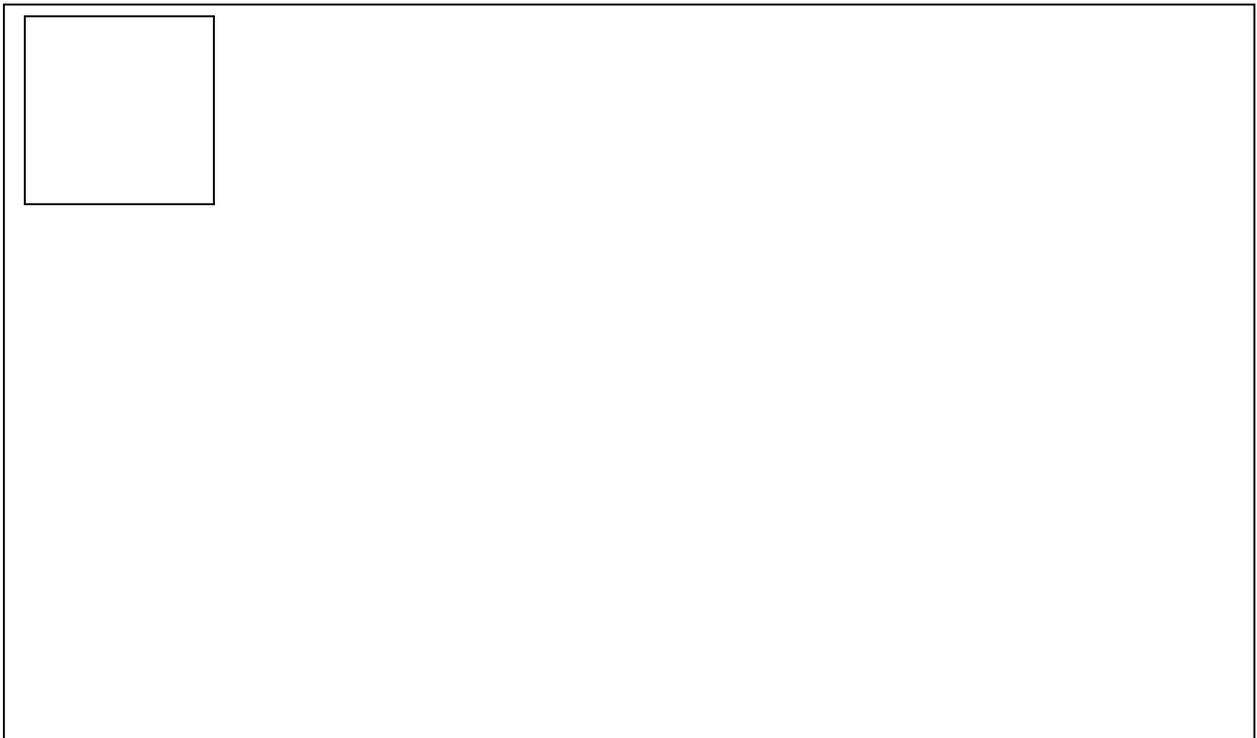


Figura 2. Alinhamento das seqüências das subclasses do gene *cry1A* das regiões conservadas (*cry1Aa*, *cry1Ac*, *cry1Ab*) e não conservadas NC (*cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1Aa*)



Figura 3. Alinhamento das seqüências das subclasses do gene *cry1A* das regiões conservadas (*cry1Ae*).

Os produtos de amplificação através dos iniciadores elaborados para as subclasses do gene *cry1A* nos isolados MT6, MT7, PR2, SP6 e SP8, difere-se dos resultados encontrados por VILAS-BÔAS & LEMOS (2004) ao utilizar iniciadores para as mesmas subclasses deste gene. Essas diferenças podem ter ocorrido em função das seqüências dos iniciadores não serem as mesmas utilizadas neste estudo.

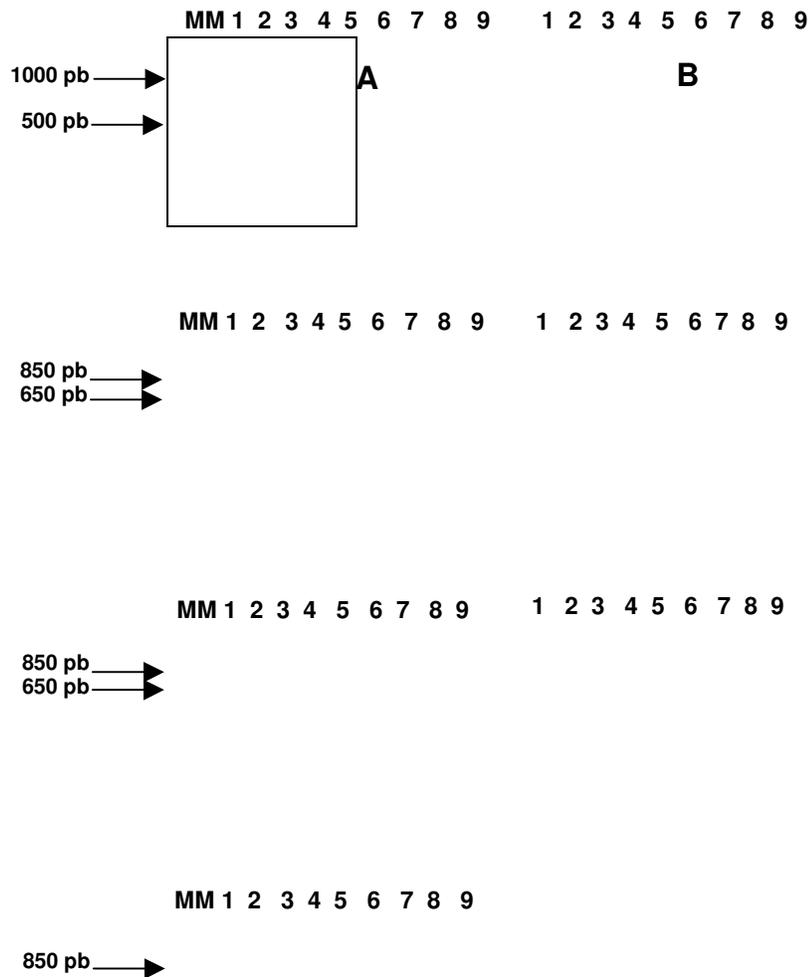


Figura 4. Amplificação das regiões conservadas (A) e não conservadas (B) dos genes *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac* e *cry1Ae* dos isolados de *B. thuringiensis*, sendo MM- marcador de tamanho molecular 1 kb Plus DNA Ladder; 1- CRY (-) E 2- PR2; 3- HD73; 4- MT7; 5- SP6; 6- SP8; 7- MT6; 8- BR6; 9- controle negativo.

4.2 Separação do material genético por ultracentrifugação

A separação do material genético por ultracentrifugação possibilitou a detecção do DNA plasmidial em todos os isolados e na subsp. *Bt kurstaki* HD73, com exceção da linhagem CRY(-)B (Figura 5).

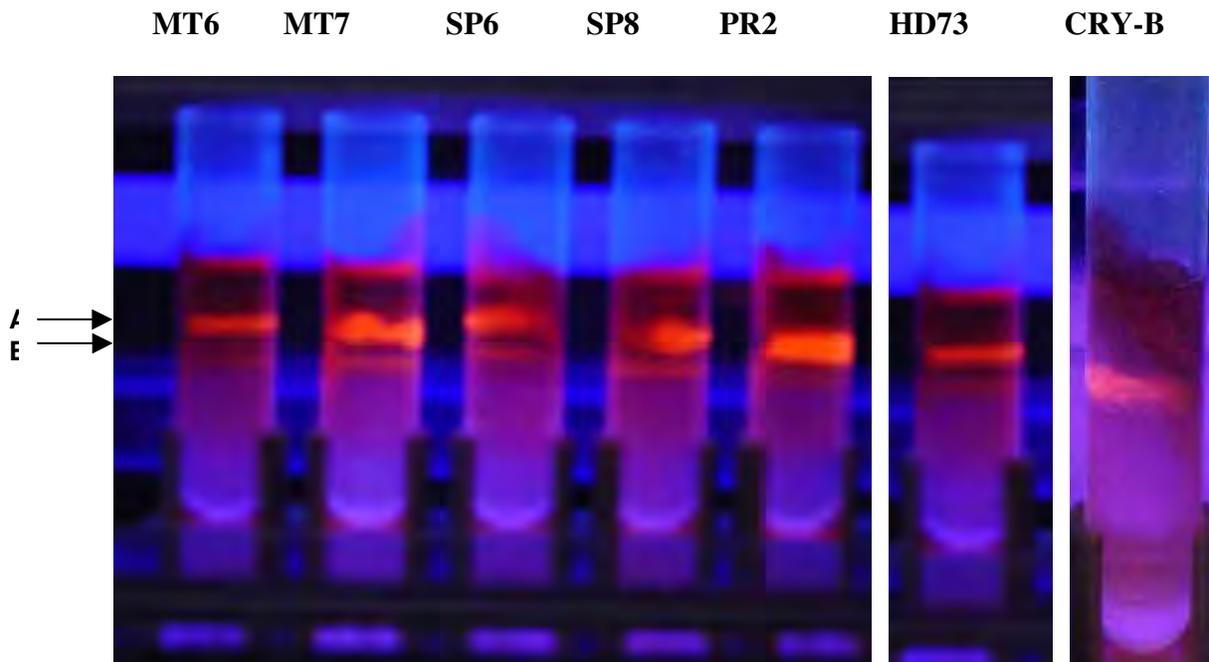


Figura 5. Separação do material genético por ultracentrifugação. (A) Material cromossomal e (B) Material plasmidial dos isolados de *B. thuringiensis*.

A restrição feita com a enzima *Eco*R1 demonstrou que os plasmídios dos isolados MT6, MT7, SP8 e SP6 apresentaram sítios de restrição semelhantes, e a subsp. *kurstaki* HD73 e o isolado PR2 apresentaram sítios que diferiram entre si e dos demais (Figura 6).

A restrição efetuada com material genético oriundo dos cromossomos permitiu a visualização de um grande número de sítios de restrição, que determinaram à presença de um “smear” (Figura 7). A restrição confirmou a ausência de contaminação de DNA plasmidial misturado com moléculas de DNA cromossômico.

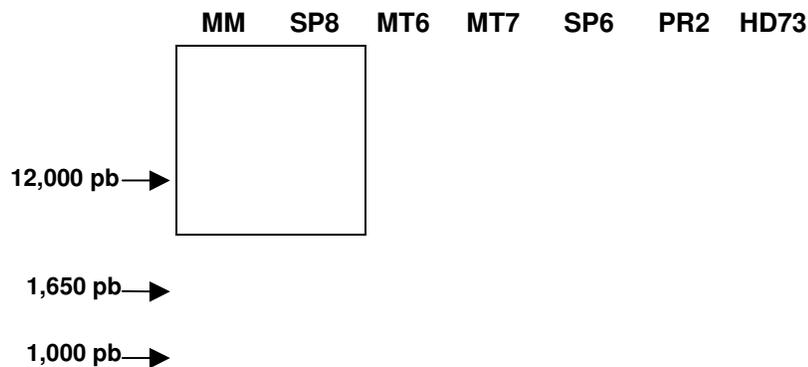


Figura 6. Restrição dos plasmídios dos isolados de *B. thuringiensis* com a enzima *Eco*RI. MM- marcador de tamanho molecular 1 kb Plus DNA Ladder.

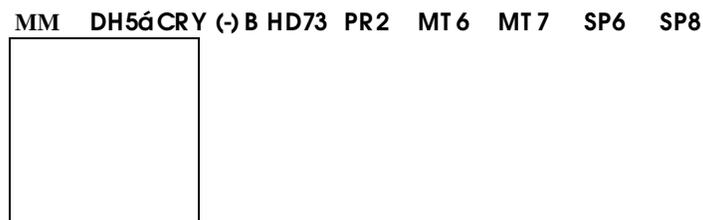


Figura 7. Restrição dos cromossomos dos isolados de *B. thuringiensis* com a enzima *EcoRI*. MM- marcador de tamanho molecular 1 kb DNA Ladder.

4.3 Análise do perfil plasmidial e caracterização cromossomal

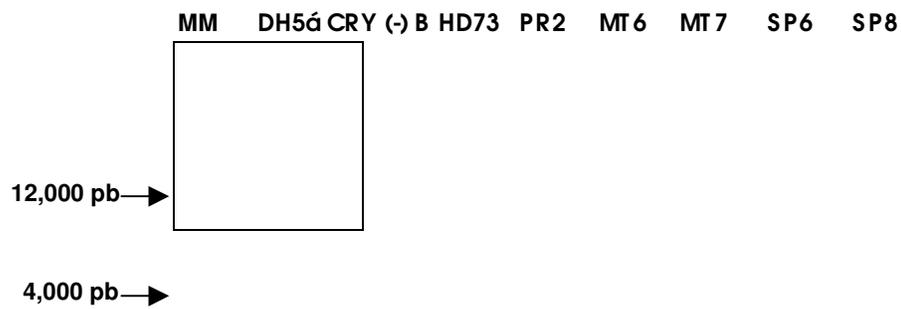
A caracterização dos cromossomos de todos os isolados foi realizada para demonstrar complementar a técnica de perfil plasmidial e comprovar a ausência de contaminantes de bandas plasmidiais nos cromossomos durante a execução desta técnica (Figura 8).

A análise dos perfis plasmidiais dos sete isolados apresentou dois perfis diferentes, sendo os isolados MT6, MT7, SP8 e SP6 evidenciaram o mesmo perfil; a subsp. *Bt kurstaki* HD73 e o isolado PR2 foram semelhantes. A subsp. CRY(-)B foi utilizada para demonstrar a ausência de perfil. (Figura 8).



12,000 pb →

Figura 8. Eletroforograma do perfil cromossomal dos isolados de *B. thuringiensis*
MM - marcador molecular 1 Kb DNA Ladder.



1,000 pb →
500 pb →

Figura 9. Perfil plasmidial dos isolados de *B. thuringiensis*. MM- marcador de tamanho molecular 1 kb DNA Ladder.

4.4 Determinação de susceptibilidade e resistência de *B. thuringiensis* aos antibióticos

A determinação da susceptibilidade e resistência dos isolados e linhagens de *B. thuringiensis*, foi avaliada pelo crescimento a ou ausência das bactérias nas placas contendo os antibióticos em todas as concentrações determinadas. Na Figura 10, podemos observar a avaliação da subsp. CRY(-) B para o antibiótico Rifampicina na concentração de 80 µg/ml.

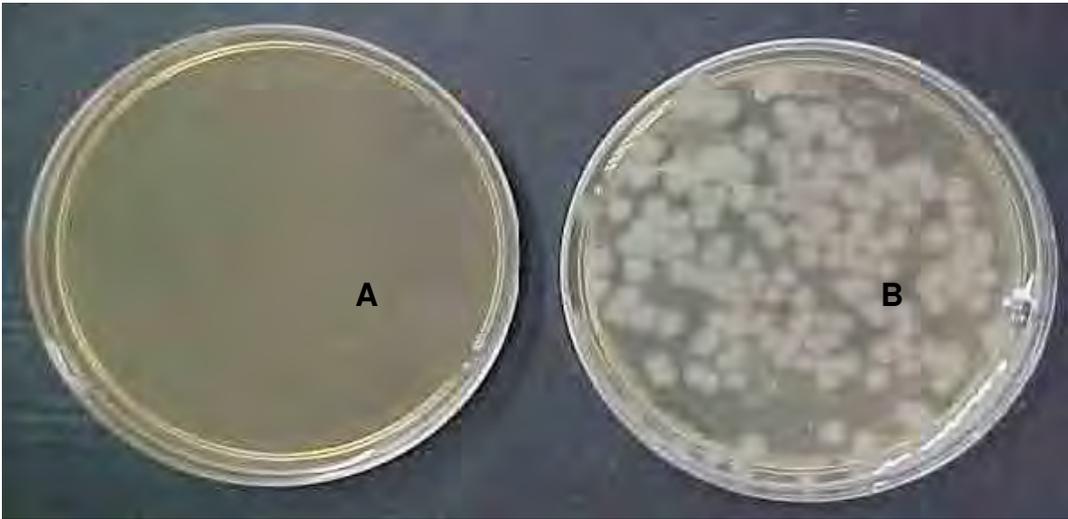


Figura 10. Análise da resistência e susceptível de células de *B. thuringiensis* subsp. CRY(-)B em meio contendo Rifampicina. (A) Isolado sensível (ausência de colônias); (B) Isolado resistente (presença de colônias).

Nesta avaliação, a subsp. CRY(-)B foi resistente ao antibiótico rifampicina em todas as concentrações, diferenciando-se dos demais que foram totalmente susceptíveis para este antimicrobiano. O eritromicina foi eficiente para inibir o crescimento de todos os isolados e linhagens, porém para o antibiótico canamicina todos apresentaram resistência.

Para o antibiótico estreptomicina ocorreu variação de resistência, sendo a subsp. *kurstaki* Bt HD73 e CRY(-)B resistentes até a concentração de 100 µg/ml e os isolados MT6, MT7, SP6, SP8 e PR2 a 60 µg/ml. Esses resultados podem ser observados na Tabela 5.

A caracterização dos isolados quanto à resistência e susceptibilidade aos antibióticos até a concentração de 120 µg/ml, permitiu associar esses resultados a outras técnicas utilizadas neste trabalho, confirmando as características dos isolados. Além disso, estes resultados indicam que a utilização de eritromicina não é indicada para isolamentos destas cepas, sendo a canamicina mais promissora para quando se deseja isolar *B. thuringiensis* de outras bactérias, pois a utilização de antibióticos,

associada às outras técnicas, como a PCR (CAVALEIRO, et al., 2005), ou a análises de microscopia óptica [(SILVA-WERNECK & MONNERAT, 2001; MONNERAT et al., 2001, citados por SILVA et al. (2002)], são utilizadas para caracterizar e identificar novos isolados de *B. thuringiensis* diferenciando-os de outras bactérias.

O emprego de diversos antibióticos pode levar a diferenciação de linhagens da mesma espécie, como ocorreu com a subespécie CRY(-) B, além de direcionar estudos de localização dos genes *cry*, colaborar com técnicas de seqüenciamento desses genes e dos plasmídios, que são muito utilizados como vetores.

Tabela 5. Resultados das análises dos isolados e linhagens de *B. thuringiensis* aos antibióticos. A letra S representa (isolado sensível ao antibiótico) e R (isolado resistente ao antibiótico). As concentrações estão representadas pelos números 40, 60, 80, 100, e 120 µg/ml.

Linhagens	Eritromicina	Estreptomicina	Canamicina	Rifampicina
CRY(-)B	S	40, 60, 80 e 100	R	R
HD73	S	40, 60, 80 e 100	R	S
MT6	S	40 e 60	R	S
MT7	S	40 e 60	R	S
SP6	S	40 e 60	R	S
SP8	S	40 e 60	R	S
PR2	S	40 e 60	R	S

Observou-se também que algumas linhagens apresentaram o mesmo comportamento, este fato pode ser atribuído à transferência de plasmídios conjugativos, contendo genes de resistência a tais drogas ou mesmo a mecanismos de desenvolvimento de resistência à ação destes tipos de agentes inibidores de crescimento bacteriano. Estes resultados, aliados as técnicas utilizadas neste estudo, permitiram inferir que o comportamento dos isolados frente aos antibióticos estão

relacionados à similaridade do material genético e não necessariamente se deve a transferência dos plasmídios conjugativos, uma vez que a origem dessas bactérias é distinta. Outro fato relevante é que esses genes de resistência podem estar localizados no cromossomo.

Essas informações servirão para futuras pesquisas que envolvam experimentos de conjugação bacteriana em que se desconheçam fatos relativos aos plasmídios considerados. Recentes pesquisas utilizaram plasmídios marcados com genes de resistência, como o plasmídio pHT73, no qual foi inserido o gene de resistência a eritromicina e estudado para verificação de sua transferência, estabilidade e expressão para outras linhagens de bactérias (HU et al., 2003), além de ser estudado em conjugação em meios sólidos (VILAS-BÔAS et al., 2000).

4.5 Análise por RAPD-PCR

As Figuras 11 e 12 ilustram os resultados da análise por RAPD-PCR. Dos 21 iniciadores utilizados na caracterização dos isolados e linhagens em estudo, somente 15 foram selecionados nas análises por apresentarem boa amplificação e presença de bandas polimórficas, sendo escolhidas 104 bandas polimórficas consideradas fidedignas e reprodutíveis.

As bandas produzidas por cada oligonucleotídeo iniciador permitiram a construção de uma matriz de similaridade que pode ser observada na Tabela 7. A partir dos valores de similaridade genética obteve-se um dendrograma utilizando-se do UPGMA como metodologia e agrupamento (Figura 13).

A utilização da técnica de RAPD possibilitou agrupar os isolados bacterianos de acordo com sua espécie na análise do dendrograma (MALKAWI et al., 1999; PATTANAYAK et al., 2001; GAVIRIA & PRIEST, 2003). O DNA de planta (P) utilizado como controle negativo apresentou 20% de similaridade com relação aos demais

isolados, a ocorrência deste fato está relacionada pelos iniciadores serem arbitrários e aleatórios, amplificando o genoma total.

A subsp. CRY(-)B apresentou menor similaridade genética (50%) em relação às demais. A subsp. *Bt kurstaki* HD73 obteve cerca de 90% de similaridade com relação aos isolados MT7, MT6, PR2, SP8, SP6 e a subsp. *Bt kurstaki* HD-1 (controle positivo), sendo que estes obtiveram 92% de similaridade entre si. A diferença de 2% da subsp. *kurstaki* *Bt* HD73 pode ser atribuída a presença de um único plasmídio de 50 MDa contendo o genes *cry1Ac* descrito por LERECLUS et al (1993). Essa diferença de 2% não foi significativa na análise final deste isolado.

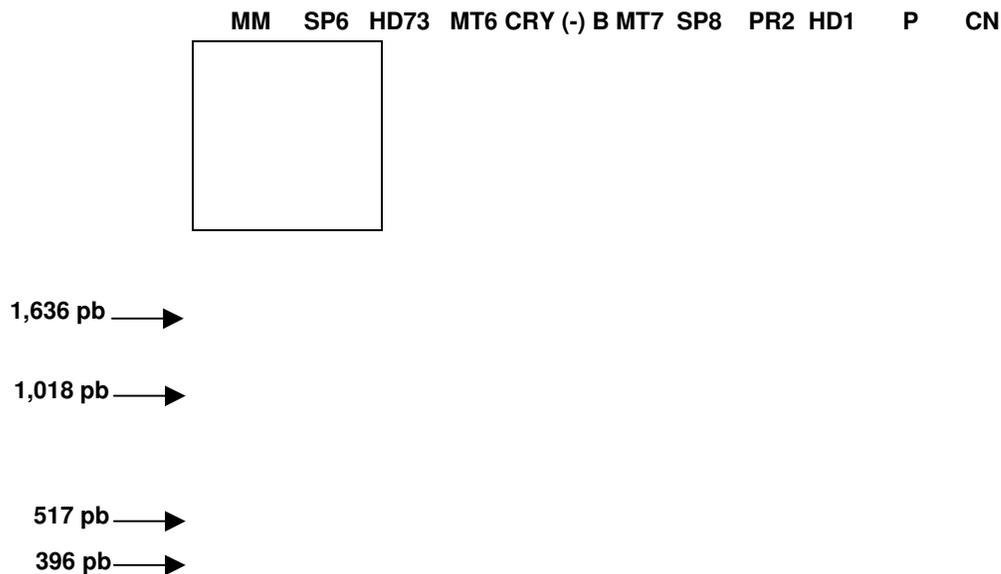


Figura 11. Amplificação dos isolados de *B. thuringiensis* com o iniciador de número 232, sendo: MM – marcador de tamanho molecular 1kb DNA Ladder; P (Planta) e CN – controle negativo.

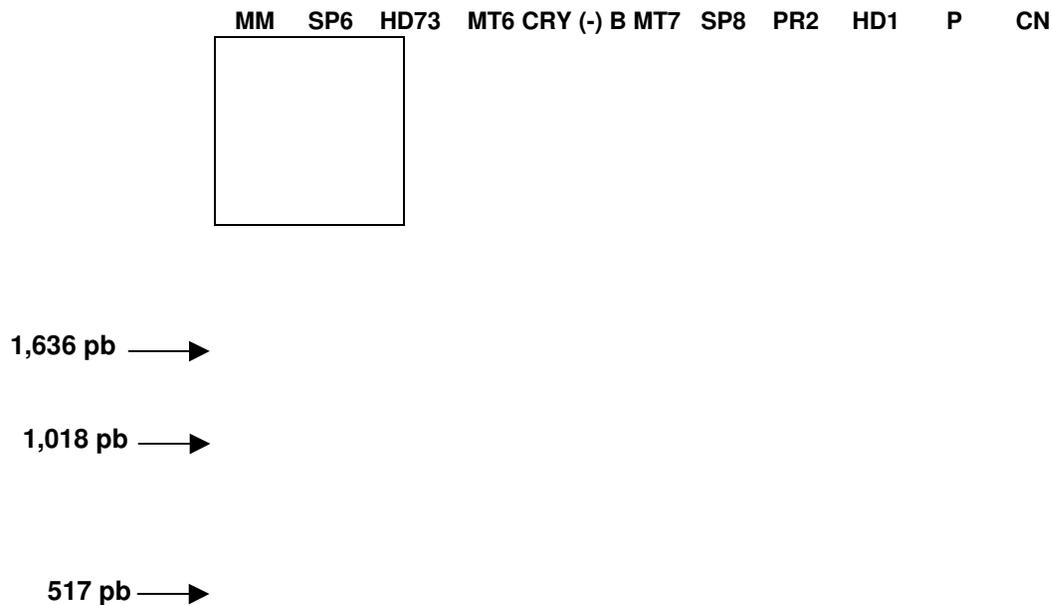


Figura 12. Amplificação dos isolados de *B. thuringiensis* com o iniciador de número 256, sendo: MM – marcador de tamanho molecular 1kb DNA Ladder; P (Planta) e CN – controle negativo.

Os isolados SP8 e SP6 apresentaram-se em um único subgrupo com 100% de similaridade, além de evidenciarem características semelhantes em todas as técnicas estudadas, indicando que podem ser idênticos. Os isolados MT6 e MT7 também apresentaram características semelhantes em todas as técnicas, no entanto, não formaram um subgrupo, indicando que talvez não sejam geneticamente idênticos.

A análise por RAPD-PCR indicou a presença de alta similaridade genética entre os isolados analisados MT6, MT7, SP8, SP6, PR2, subsp. *kurstaki* HD73 e com o linhagem *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1, além de apresentar a existência de baixa variabilidade genética. A técnica do RAPD-PCR e perfil plasmidial podem diferir de

alguns trabalhos por terem sido desenvolvidos através de metodologias diferentes, como as seqüências dos iniciadores aleatórios no RAPD e extração do DNA plasmidial.

Tabela 7. Matriz de similaridade genética entre os isolados de *B. thuringiensis*.

	SP6	HD73	MT6	CRY(-)B	MT7	SP8	PR2	HD1	P
SP6	1,00								
HD73	0,95	1,00							
MT6	0,99	0,94	1,00						
CRY(-)B	0,59	0,61	0,58	1,00					
MT7	0,98	0,94	0,97	0,58	1,00				
SP8	1,00	0,95	0,99	0,59	0,98	1,00			
PR2	0,99	0,96	0,98	0,59	0,97	0,99	1,00		
HD1	0,99	0,94	0,98	0,59	0,97	0,99	0,98	1,00	
P	0,22	0,22	0,22	0,24	0,22	0,22	0,21	0,21	1,00

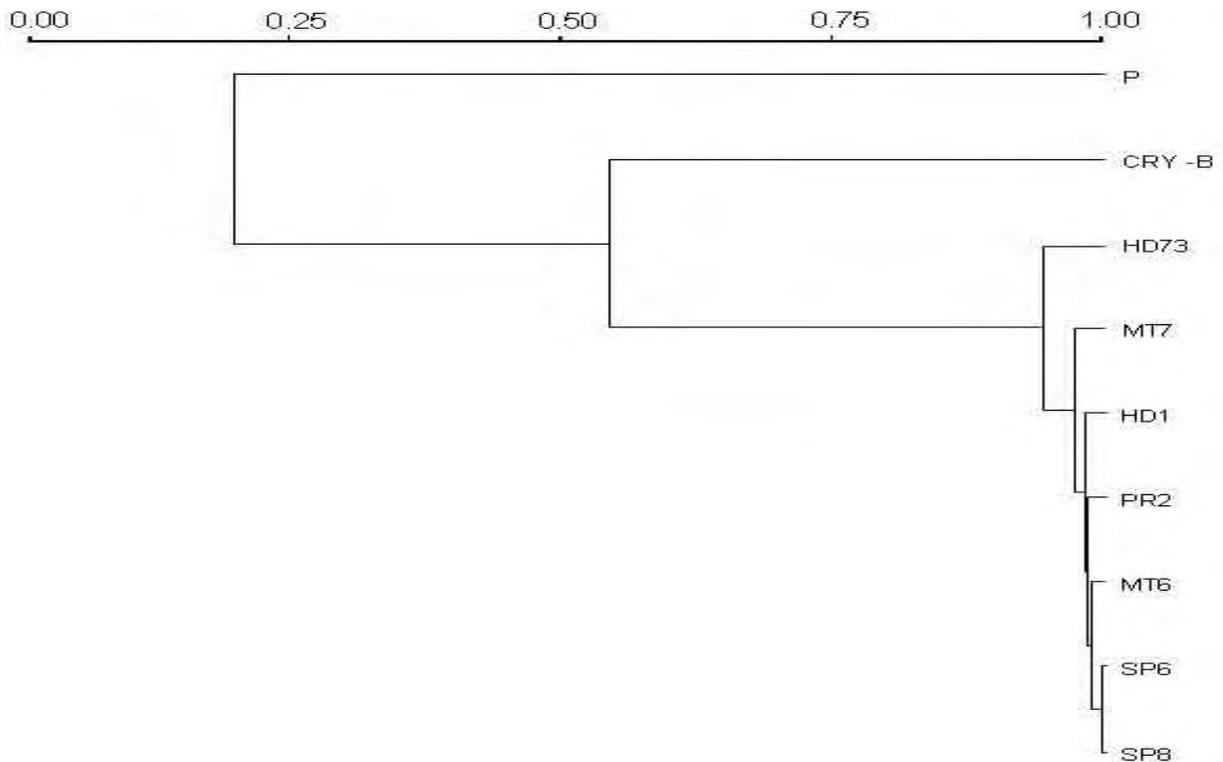


Figura 13. Dendrograma de similaridade genética entre os isolados de *B. thuringiensis*, obtido pelo coeficiente de similaridade UPGMA.

4.6 Bioensaios efetivos a *Spodoptera frugiperda*

Nos resultados dos bioensaios (Tabela 6) os isolados SP6, PR2, SP8, MT6, MT7, e a subsp. *kurstaki* HD73 não diferiram significativamente entre si, causando 100% de mortalidade, sendo as mais promissoras para o controle de *S. frugiperda*, assim como a linhagem *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1, a qual tem amplo espectro de atividade larvicida dentro da Ordem Lepidoptera (NAVON, 1993), que neste estudo foi utilizada como controle positivo. No entanto, diversas espécies de *Spodoptera* spp pertencentes à família Noctuidae, são poucos sensíveis a esses produtos (MOAR et al., 1990; INAGAKI et al., 1992; NAVON, 1993; LAMBERT et al., 1996). Os bioensaios demonstraram o potencial patogênico dos isolados e linhagens no controle de lagartas de primeiro ínstar de *S. frugiperda*, porém, o estudo da Concentração Letal Média (CL₅₀) se torna necessário para verificar as linhagens mais tóxicas quando comparadas com a subsp. *kurstaki* padrão HD-1 (FINNEY, 1971). De acordo com LEE et al. (1996); SCHNEPF et al. (1998), a correlação das subclasses do gene *cry1A* com bioensaios, indica que a toxicidade de algumas estirpes aos insetos-alvo pode ocorrer por causa das interações sinérgicas entre as toxinas encontradas, ou mesmo, pela interação destas com os esporos, tornando-se necessário realizar e analisar bioensaios com proteínas individuais e em conjunto para confirmar a toxina responsável pela mortalidade.

Os resultados dos bioensaios a princípio já eram esperados, pois os produtos de amplificação das subclasses do gene *cry1A* são semelhantes, aliado a alta similaridade genética evidenciada pela análise de RAPD-PCR. Tendo os resultados da taxa de mortalidade idênticos, uma análise mais detalhadas de como a expressão gênica dessas subclasses torna-se importante para avaliar se essas subclasses estão sendo

expressas em igual condição ou qual está sendo expressa ou ainda se ocorre uma relação sinérgica entre elas.

Esta análise também explicaria o que ocorreu com o isolado PR2, que não amplificou para duas subclasses, mas causou mortalidade igual aos outros isolados.

A subsp. CRY(-)B não causou mortalidade no controle desta praga podendo ser utilizada como um controle negativo, pois apresentou mortalidade igual à testemunha (8%). Seu desempenho durante o bioensaio confirmou os resultados observados em todas as técnicas realizadas como a ausência de amplificação dos genes *cry*, ausência de plasmídios, única linhagem resistente a rifampicina e 50% de similaridade genética no RAPD, sendo caracterizada como uma linhagem diferente das demais.

Tabela 6. Mortalidade (\pm EP) de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (Lep.: Noctuidae) por diferentes isolados de *B. thuringiensis* após cinco dias de inoculação.

Isolados e linhagens de <i>B. thuringiensis</i>	% de mortalidade \pm EP
SP6	100,00 \pm 0,00 A
HD73	100,00 \pm 0,00 A
PR2	100,00 \pm 0,00 A
SP8	100,00 \pm 0,00 A
MT6	100,00 \pm 0,00 A
MT7	100,00 \pm 0,00 A
HD1	100,00 \pm 0,00 A
CRY(-)B	8,00 \pm 3,73 B
Testemunha (água)	8,00 \pm 3,73 B

CV = 6,41% Médias seguidas por letras distintas diferem 5% entre si pelo teste de Tukey.

5. Conclusões

- Os isolados MT6, MT7, PR2, SP6, SP8 e a subsp. *kurstaki* HD73 analisados pelas técnicas de PCR, determinação de resistência e susceptibilidade a antibióticos, perfil plasmidial, RAPD e bioensaio de patogenicidade, demonstraram alta similaridade genética em sua caracterização.
- A subsp. CRY(-)B não apresentou similaridade genética com nenhum dos isolados e tornou-se uma linhagem de controle para todos as técnicas realizadas.
- Todas as técnicas realizadas demonstram-se eficientes e complementares na caracterização de um menor grupo de isolados.
- Para a caracterização de um maior grupo de isolados a técnica de PCR, RAPD-PCR e bioensaios, apresentam-se mais viáveis economicamente.
- A subsp. *Bt kurstaki* HD73 e os isolados MT6, MT7, PR2, SP6, SP8 apresentam as subclasses do gene *cry1A* e demonstram potencial no controle de lagartas de primeiro ínstar de *S. frugiperda*.

6. Referências Bibliográficas

ARANGO, J. A.; ROMERO, M.; ORDUZ, S. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Colombia with insecticidal activity against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Applied Microbiology**, Oxford. v. 92, n. 8, p. 466-474, 2002.

ÁVILA, C. J.; NAKANO, O. Efeito do regulador de crescimento lufenuron na reprodução de *Diabrotica speciosa* (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 28, n. 2, p. 293-299, jun. 1999.

BARRETO, M. R. Atividade inseticida do sobrenadante da cultura de cepa de *Bacillus thuringiensis* Berliner contra lagartas de *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Itabuna, v. 28, n. 4, p. 675-685, 1999.

BATISTA, A. C.; MELLATI, V. M.; DEMO, C.; MARTINS, E. S.; PRAÇA, L. B.; GOMES, A. C. M. M.; FALCÃO, R.; BROD, C. S.; MONNERAT, R. G. Prospecção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas no controle de *Anticarsia gemmatilis*. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, Brasília, v. 82, n. 1, p. 19, 2005.

BERTELS, A. Estudos da influência da umidade sobre a dinâmica de flutuação de lepidópteros, pragas do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 5, n. 1, p. 67-79, 1970.

BIANCO, R. Pragas e seu controle. In. FUNDAÇÃO INSTITUTO AGRONÔMICO DO PARANÁ, **A cultura do milho no Paraná**. Londrina, 1991. p.185-221. (IAPAR. Circular,

29).

BOHOROVA, N.; MACIEL, A. M.; BRITO, R. M.; AGUILLART, L.; IBARRA, J. E.; HOISINGTON, D. Selection and characterization of mexican strains of *Bacillus thuringiensis* active against four major lepidopteran maize pests. **Entomophaga**, Paris, v. 41, n. 2, p.153-165, 1996.

BOURGOUI, C.; DELÉCLUSE, A. ; RIBIER, J. ; KLIER, A . ; RAPOPORT, G. ; *Bacillus thuringiensis* subsp. Israelensis gene encoding a 125-kilodalton larvicidal poplyeptid is associated with inverted repeat sequences. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 170, n. 8, 3573-3583, 1988.

BRAVO, A.; SARABIA, S.; LOPEZ, L.; ONTIVEROS, H.; ABARCA, C.; ORTIZ, A.; ORTIZ, M.; LINA, L., VILLALOBOS, F. J.; PENA, G.; NUNEZ-VALDEZ, M. E.; SOBERON, 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 insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polimerase chain reaction product perfiles. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, n.11, p.3057-3061, 1991.

CARVALHO, R. P. L.; 1970. Danos, flutuação da população, controle e comportamento de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) e susceptibilidade de diferentes genótipos de milho em condições de campo. Tese de Doutorado. Piracicaba, ESALQ. 170p.

CARVALHO, A. O. R. Pragas e seu controle. In: FUNDAÇÃO INSTITUTO AGRONÔMICO DO PARANÁ, **O milho no Paraná**. Londrina, 1982. p.141-148. (IAPAR.

Circular, 68).

CAVALEIRO, H.; PRAÇA, L. B.; MARTINS, E. S.; MEDEIROS, P. T.; GOMES, A. C. M. M.; MONNERAT, R. G. Novas estirpes de *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus sphaericus* testadas contra larvas de insetos da ordem lepidoptera e Díptera. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, Brasília, v. 87, 22 p., 2005.

CLAEYS, G.; BAERE, T.; WAUTERS, G.; VANDECANDELAERE, P.; VERSCHRAEGEN, G.; MUYLAERT, A.; VANEECHOUTTE, M. Extended-Spectrum β -lactamase (ESBL) producing *Enterobacter aerogenes* phenotypically misidentified as *Klebsiella pneumoniae* or *K. terrigena*. **BMC Microbiology**, Belgium, v.4, 5p., 2004.

COOPING, L. G.; MENN. J. J. Review biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. **Pest Management Science**, Sussex, v. 56, n.5, p. 651-676, 2000.

COOPLANTIO. **Lagarta-do-cartucho ou lagarta-militar**, *Spodoptera frugiperda* (**Lep., Noctuidae**). Disponível em: <http://www.cooplantio.com.br/scripts/cooplantio/pg>. (06 de ago.2003).

CRUZ, I. **A lagarta-do-cartucho na cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa, 1995. 45 p. (Circular Técnica 21).

CRUZ, I.; BIANCO, R. Manejo de Pragas na Cultura do Milho Safrinha. SEMINÁRIO NACIONAL DE MILHO SAFRINHA, 6., 2001, Londrina. IAPAR, 2001. p.79-112.

CRUZ, I.; FIGUEIREDO, M. L. C.; OLIVEIRA, A. C.; VASCONCELOS, C. A. Damage of *Spodoptera frugiperda* (Smith) in different maize genotypes cultivated in soil under tree

levels of aluminium saturation. **International Journal of Pest Management**, London, v. 45, n. 4, p. 293-296, 1999.

CRUZ, I., OLIVEIRA, L.J.; OLIVEIRA, A. C.; VASCONCELOS, C. A.; 1996. Efeito do nível de saturação de alumínio em solo ácido sobre os danos de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) em milho. An. Soc. Entomol. Brasil 25:293.

CUNHA, W. C. Contribuição ao estudo do antibiograma. **Hospital**, Rio de Janeiro, v. 76, n. 4, p. 1399-1404, 1969.

DIAS, S. C.; SAGARDOY, M. A.; SILVA, S. F.; DIAS, J. M. C. S. Characterization and pathogenic evaluation of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus* isolates from argentinean soils. **BioControl**, Dordrecht, v. 44, n.1, p. 59-71, 1999.

DIEZ-RODRIGUES, G. I.; OMOTO, C. Herança da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a lambda-cialotrina. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 30, n. 2, p. 311-316, 2001.

DUCASSE, D. A. La reacción em cadena de la polimerasa (PCR). In: DOCAMPO, D. M.; LENARDON, S. L. (Ed.). **Métodos para detectar patógenos sistêmicos**. IFFIVE-INTA-JICA, 1999. p. 57.

FAVA NETO, C. Antibiograma. In: LACAZ, C. S. **Antibióticos**. 3. ed. São Paulo: Edgard Blucher/EDUSP, 1975. p. 221.

FERRAZ, M. C. V. D. **Determinação das exigências térmicas de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera, Noctuidae) em culturas de milho**. 1982. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 81 f.,1982.

FERRÉ, J.; VAN RIE, J. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, n. 47, p. 501-533, 2002.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD). **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análises genética**. Brasília: Embrapa/Cenargem, 1995. p. 38-53.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: Embrapa-Cenargem, 1998. 220 p.

FINNEY, D. J. **Probit analysis**. 3. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1971. 333 p.

GALLO, D. et al. **Entomologia agrícola**. 3. ed. Piracicaba: FEALQ, 2002. v. 10, 920 p.

GAVAN, T. L. *In vitro* antimicrobial susceptibility testing. **Medical Clinics of North America**, Philadelphia, v. 58, n. 3, p. 493-503, 1974.

GAVIRIA RIVERA, A. M.; PRIEST, F. G. Molecular typing of *Bacillus thuringiensis* serovars by RAPD-PCR. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 26, n. 2, p. 254-261, 2003.

GLARE, T. R.; O'CALLAGHAN, M. ***Bacillus thuringiensis*: biology, ecology and safety**. Chichester: John Wiley, 200. 350 p.

GOULD, J. C. The laboratory control of antibioticotherapy. **British Medical Bulletin**, Edinburg, v. 3, n. 1, p. 92-98, 1980.

GONZÁLES, J. M. J.; BROWN, B. S.; CARTON, B. C. Transfer of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v. 79, p. 6951-6955, 1982.

GROSSCURT, A. C. Diflubenzuron: some aspects of its ovicidal and larvicidal mode of action and evaluation of its practical possibilities. **Pesticide Science**, London, v. 9, p. 373-386, 1978.

GRÜTZMACHER, A. D.; MARTINS, J. F. da S.; CUNHA, U. S. da. Insetos-pragas das culturas do milho e sorgo no agroecossistema de várzea. In: PARFITT, J. M. B. **Produção de milho e sorgo em várzea**. Pelotas, EMBRAPA Clima Temperado, 2000. p. 87-102

HAMPL, V.; PAVLICEK A.; FLEGR J. Construction and bootstrap analysis of DNA fingerprinting-based phylogenetic trees with the freeware program Free Tree: application to trichomonad parasites. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 51, n. 3, p. 731-735, 2001.

HAZEM, A.; MANAR, A. Genetic polymorphism by RAPD-PCR and phenotypic characteristics of isolated thermotolerant *Bacillus* strains from hot spring sources. **New Microbiology**, Jordan, v. 26, n. 3, p. 249-256, 2003.

HOFTE, H.; WHITELEY, H. R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 53, n. 3, p. 242-255, 1989.

HU, X.; HANSEN, B. M.; YUAN, Z.; EILENBERG, J.; HENDRIKSEN, N. B.; SMIDT, L.; JENSES, G. B. Conjugative transfer, stability and expression of a plasmid encoding a cry1Ac gene in *Bacillus cereus* group strains. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 231, n. 1, p. 45-52, 2004.

INAGAKI, S.; MIYASONO, M.; ISHIGURO, T.; TAKEDA, R.; HAYASHI, Y. Proteolytic processing of δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 in insensitive insect, *Spodoptera litura*: unusual proteolysis in the presence of sodium dodecyl sulfate. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 60, n. 1, p. 64-68, 1992.

JARRET, P.; STEPHENSON, M. Plasmid transfer between strains of *Bacillus thuringiensis* infecting *Galleria mellonella* and *Spodoptera littoralis*. **Applied and Environmental Entomologist**, Washington, v. 63, n. 4, p. 468-480, 1990.

KNIPLING, E. F. Regional management of the fall armyworm – a realistic approach? **Florida Entomologist**, Ottawa, v. 63, n. 4, p. 468-480, 1980.

KNOWLES, B. H. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal δ -endotoxins. *Advance in Insect Physiology*, v.24, n.2, p.275-308, 1994.

KONEMAN, E. W. **Color atlas and textbook of diagnostic microbiology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott, 1997. 1395 p.

KRONSTAD, J W.; WHITELEY. H. R. Three classes of homologous *Bacillus thuringiensis* crystal-protein genes. **Gene**, Amsterdam, v. 43, n. 1, p. 29-40, 1984.

LAMBERT, B.; BUYSSE, L.; DECOCK, C.; JANSENS, S.; PIENS, C.; SAEY, B.; SEURINCK, J.; VAN AUDENHOVE, K.; VAN RIE, J.; VAN VLIET, A.; PEFFEROEN, M. A *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein with a high activity against members of the family Noctuidae. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n.1, p.80-86, 1996.

LEE, M.K.; CURTISS, A.; ALCANTARA, E.A.; DEAN, D.H. Synergistic effect of the *Bacillus thuringiensis* toxins CryIAa and CryIAC on the gypsy moth, *Lymantria dispar*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 2, p. 583-586, 1996.

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

LERECLUS, D.; Ribier, J.; Klier, A.; Menou, G.; Lecadet, M. M. A transposon-like structure related to the delta-endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*. **EMBO Journal**, Oxford, v. 3 (11), p. 2561-2567, 1984.

MALKAWI, H.I.; AL-MOMANI, F.; MEQDAM, M. M.; SAADOUN, I.; MOHAMMADE, M J. Detection of genetic polymorphism by RAPD-PCR among isolates of *Bacillus thuringiensis*. **New Microbiology**, New York, v. 22, n. 3, p. 241-247, 1999.

MARMUR, J. A. Procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 3, n. 1, p. 208-218, 1961.

MOAR, W. J.; MASSON, L.; BROUSSEAU, R.; TRUMBLE, J.T. Toxicity to *Spodoptera exigua* and *Trichoplusia ni* of individual P1 protoxins and sporulated cultures of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* HD-1 an NRD-12. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, n .8, p. 2480-2483, 1990.

MONNERAT, R. G.; SILVA, S. F. da; WERNWCK, J. O. S.; DIAS, J. M. C. S. **Métodos de coleta, isolamento, caracterização e armazenamento de estirpes de *B. sphaericus***. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. 4 p. (Circular Técnica, 9).

MULLIS, J. B. The unusual origin of the polymerase chain reaction. **Scientific American**, New York, v. 262, n. 1, p. 56-65, 1990.

MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalysed chain reaction. **Methods in Enzymology**, New York, v. 55, n. 2, p. 335-350, 1987.

NAVON, A Control of lepidopteran pests with *Bacillus thuringiensis*. In: ENTWISTLE, P. F.; CORY, J. S.; BAILEY, M. J.; HIGGS, S. (Ed.). ***Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: theory and practice**. Chichester: John Wiley & Sons, 1993. p. 125-146.

NEI, M. Definition estimation of fixation indices. **Evolution**, Laurence, v. 40, n. 3, p.643-645, 1986.

NOVICK, R. P.; CLOWES, R. C.; COHEN, S. N.; CURTISIII, R.; DATTA, N.;FALKOW, S. Uniform nomenclature for bacterial plasmid: a proposal. **Bacteriological Reviews**, Baltimore, v. 40, n. 1, p. 168-189, 1976.

PAGE, R.D.M. TREEVIEW: an application to display phylogenetic trees on personal computers. **Computational Applied Bioscience**, v.12 (4), p. 357-358, 1996.

PATTANAYAK, D.; CHAKRABARTI, S. K.; KUMAR P. A.; NAIK, P. S.; Characterization of genetic diversity of some serovars of *Bacillus thuringiensis* by RAPD. **Indian Journal of Experimental Biology**, New Delhi, v. 39, n. 9, p. 897-901, 2001.

PARRRA, J. R. P.; HADDAD. M. L. **Determinação do número de instares de insetos**. Piarcicaba: Fealq, 1989. 49 p.

PEDIGO, L. P. **Entomology and pest management**. New York: MacMillan, 1989. 646p.

PETERSDORF, R. G.; FLORDE, J. J. The usefulness of in vitro sensivity test in atibiotic therapy. **Annual Review of Medicine**, Palo Alto, v. 14, n. 1, p. 41-56, 1963.

PETERSDORF, R. G.; SHERRIS, J. C. Methods and significance of in vitro testing of bacterial sensitivity to drugs. **Am J Med**, v. 39, n. 5, p. 766-779, 1965.

POLANCZK, R. A. **Estudo de *Bacillus thuringiensis* Berliner visando o controle de *Spodoptera frugiperda***. 2004. Tese de Doutorado em Ciências, Área de Concentração: Entomologia – Escola Superior de Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004, 145 p.

POLANCZYK, R. A.; SILVA, R. F. P. DA; FIUZA, L. M. Effectiveness of *Bacillus thuringiensis* strains against *Spodoptera frugiperda*, (Lepidoptera: Noctuidae). *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, v. 31, n. 3, 2000.

PORCAR, M.; JUARÉZ-PÉREZ, V. pPCR-based identification of *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal genes. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 26, n. 5, p. 419-432, 2003.

PRACA, L. B.; BATISTA, A. C.; MARTINS, E. S.; SIQUEIRA, C. B.; DIAS, D. G. S.; GOMES, A. C. M. M.; FALCÃO, R.; MONNERAT, R. G. Estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos das ordens Leptoptera, Coleoptera e Díptera. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 1, p. 11-16, 2004.

REDDY, A.; BATTISTI, L. THORNE, C. B. Identification of self-transmissible plasmids in four *Bacillus thuringiensis* subspecies. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 169, n. 11, p. 5263-5270, 1987.

ROSENBLATT, J. E. Laboratory tests to guide antimicrobial therapy. **Mayo Clinic Proceedings**, Rochester, v. 58, n.1, p.14-20, 1983.

SALVADORI, J. R., QUINTELA, E. D., CORREIA, A. C. B., ALVES, S. B. Efeito de *Bacillus thuringiensis* sobre parâmetros biológicos de *Spodoptera frugiperda*. In:

CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 10, Rio de Janeiro, 1986, **Anais**. Rio de Janeiro - RJ: Sociedade Entomológica do Brasil. 1986. v.1. p.201.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning** : A laboratory manual. 3. ed. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 309 p.

SÁNCHEES-YÁN~EZ, J. M.; PENÃ-CABRIALES, J. J. Persistencia de esporas de *Bacillus thuringiensis* en hojas de maiz, de frijol y en el suelo. **Terra Latino Americana**, Chapingo, v. 18, n. 4,p. 325-331, 2000.

SAUNDERS, J. R. Genetics and evolution of antibiotic resistance. **British Medical Bulletin**, Harlow, v. 40, n.1, p. 40-64, 1984.

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

SCHROEDER, W. J.; BEAVERS, J. B.; SUTTON, R. A.; SELHIME, A. G. Ovicidal effect of Thompson-Hayward TH 6040 in *Diaprepes abbreviatus* on citrus in Florida. **Journal of Economic Entomology**, Maryland, v. 69, n. 6, p. 780-782, Dec. 1976.

SCHROEDER, W. J.; SUTTON, R. A. *Diaprepes abbreviatus*: suppression of reproductive potential on citrus with an insect regulator plus spray oil. **Journal of Economic Entomology**, Maryland, v. 71, n. 1, p. 69-70, Jan. 1978.

SILVA, S. F. da; DIAS, J. M. C. S.; MONNERAT, R. G. **Isolamento, identificação e caracterização entomopatogênica de bacilos de diferentes regiões do Brasil**. Brasília: Embrapa, 2002. 4p. (Comunicado Técnico, 70).

SILVA-WERNECK, J. O.; ABREU NETO, J. R. M. V.; TOSTES, A. N.; FARIA, L. O., DIAS, J. M. C. S. Novo isolado de *Bacillus thuringiensis* efetivo contra a lagarta do cartucho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 1, p. 221-227, 2000.

SILVA-WERNECK, J. O.; MONNERAT, R. G. **metodologias para caracterização de isolados de *Bacillus thuringiensis***. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. 4 p. (Circular Técnica, 10).

SILVEIRA, L. C.; VENDRAMIM, J. D.; ROSSETO, C. J. Efeito de genótipos de milho no desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Itabuna, v. 26, n. 2, p. 291-298, 1997.

SNEATH, P. H. A.; SOKAL, R. R. **Numerical taxonomy the principles and practice of numerical classification**. San Francisco: W. H. Freeman, 1978.

SUASSUNA, I. Interpretação clínica de antibiograma. **Ars Curandi**, v. 7, n. 5, p. 38-50, 1974.

SUTTER, V. L.; OUTROS AUTORES. Standardized antimicrobial disc susceptibility testing of anaerobic bacteria. **Applied of Microbiology**, Washington, v. 23, n. 2, p. 268-275, 1972.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1996. 792 p.

THOMAS, D. J. I.; MORGAN, J.; ALUN, W.; WHIPPS, J. M.; SAUNDER, J. R.. Plasmid transfer between *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis* strain in laboratory culture, river water, and dipteran larvae. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n.1, p. 330-338, 2001.

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**, Oxford. v. 22, n. 22, p. 4673-4678, 1994.

TRABULSI, L. R. **Microbiologia**. Rio de Janeiro: Atheneu, 1991. p. 400.

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

VALICENTE, F. H.; COSTA, E. F. dA. Controle da lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda*, (J. E. Smith), com o *Baculovirus spodoptera* aplicada via água de irrigação. **Anais da Sociedade Entomológica da Brasil**, v.24, n.1. p. 61-67, 1995.

VALICENTE, F. H.; CRUZ, I. **Controle biológico da lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda*, com o baculovirus**. Sete Lagoas: Embrapa, 1991. 23 p.

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

VILAS-BÔAS, G. F. L. T., VILAS-BÔAS, L. A.; LERECLUS, D.; ARANTES, O. M. N. *Bacillus thuringiensis* conjugation under environmental conditions. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 25, p. 369-374, 1998.

VILAS-BÔAS, G. T.; VILAS-BÔAS, G. F. L. T.; SARIDAKIS, H. O.; LEMOS, M. V. F.; LERECLUS, D.; ARANTES, O. M. N. Survival and conjugation of *Bacillus thuringiensis* isolated from Brazil. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 31, p. 255-259, 2000.

WAQUIL, J. M.; VIANA, P. A.; LORDELLO, A. I.; CRUZ, I.; OLIVEIRA, A. C. Controle da lagarta-do-cartucho em milho com inseticidas químicos e biológicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.17, n.2 p.163-166. 1982.

WASHINGTON II, J. A. How the microbiology laboratory can improve antimicrobial therapy. **Bulletin New York of the Academy of Medicine**, New York, v. 60, n. 4, p. 314-326, 1984.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R. K.; LIVAK, J. L. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.18, n. 22, p. 6531-6535, 1990.

YAMAMOTO, T.; DEAN, D. H. Insecticidal proteins produced by bacteria pathogenic to agricultures pests. In: CHARLES, J. F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LEROUX, C. (Ed.). **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application**. Ottawa: Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 81-100.

YU, S. J. Detection and biochemical characterization of insecticide resistance in fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal Economic Entomology**, Lanhan, v.85, n. 3, p. 675-682, 1992.