

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM GENE *cry*
RECOMBINANTE DE *Bacillus thuringiensis* var. *londrina***

Irlan Leite de Abreu

Prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos

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

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Setembro de 2006

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Irlan Leite de Abreu, nascido em 30 de setembro de 1970 na cidade de São Paulo é biólogo, graduado na Faculdades Integradas Riopretense – mestre em Microbiologia Agropecuária pela Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Campus de Jaboticabal. É docente responsável pelas disciplinas de bioquímica e biotecnologia no Centro Universitário de Rio Preto (UNIRP).

Aos meus pais

IRAN LEITE DE ABREU

MARIA APARECIDA DE ABREU

por me ensinar que sonhar e amar não é impossível

Aos meus irmãos

IRAN LEITE DE ABREU FILHO

IVANA LEITE DE ABREU (IN MEMORIAN)

IVIENE LEITE DE ABREU

MARIA EMÍLIA LEITE DE ABREU

por todo amor, carinho, respeito e alegria

Aos meus lindos sobrinhos

RIOLANDO, MARIANA, MATHEUS

MIGUEL E VICTOR

por dedicação e ternura

A minha filha **MARINA** pela beleza

E ternura em minha vida

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A **DEUS** por estar sempre junto de mim e iluminar meu caminho.

Ao Prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos, a quem admiro e respeito pela pessoa, ética e competência profissional, agradeço pela orientação e a todos esses anos de convivência e ensinamento e a realização deste trabalho, e em especial pela amizade, confiança e atenção dispensadas.

À Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério Sena, pela amizade e compressão em todas as partes difíceis que passei e principalmente pelas sugestões no aperfeiçoamento deste trabalho.

À Eliane Cristina da Cunha Alves, pelo importante auxílio do experimento e sua amizade e carinho que fará falta em minha vida.

Aos Professores: que convivi todos esses anos pelas sugestões no ensinamento os quais contribuíram para o aperfeiçoamento da minha carreira.

Agradeço a uma pessoa especial que no momento que fez parte da minha vida trouxe luz, esperança, carinho e afeto em um relacionamento sincero e lindo a você Camila Chiaradia Davolos.

Aos amigos Luciano T. Kishi, Erico Leandro da Silveira e Paulo Sarmanho pelo convívio e determinação nas fases mais difíceis que passamos juntos.

À minhas amigas Ana Maria e Viviane por sempre estarem ao meu lado mesmo sendo difícil suportar, mostrando que amizade não tem preço.

Aos amigos de laboratório, Simone, Paulo, Marta, Matheus e outros pelo auxílio, convívio, carinho e amizade.

Aos professores da Faculdade pelos ensinamentos.

Aos funcionários da Biblioteca do Campus, pela prestação de serviços.

Aos funcionários do Departamento de Biologia Aplicada.

Ao Departamento de Biologia, por ceder o espaço físico e a infra-estrutura para realização do experimento.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação pelo esclarecimento e condução nas tarefas de atendimento às normas regulamentares.

Aos colegas do curso de Pós-Graduação, pela amizade.

Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

Resumo.....	3
Summary.....	4
1. Introdução.....	5
2. Revisão de Literatura.....	8
3. Material e Métodos.....	18
3.1 Linhagens bacterianas.....	18
3.2 Condições de cultivo das bactérias.....	19
3.3 Extração do DNA genômico.....	20
3.4 Identificação dos genes <i>cry3Aa</i> e <i>cry1</i> por PCR.....	22
3.5 Purificação de cristais.....	25
3.6 Análise morfológica da proteína por microscopia eletrônica de varredura.....	25
3.7 Separação de DNA plasmidial e cromossomal por gradiente de cloreto de cério.....	26
3.8 Identificação da presença do gene <i>cry3</i> no plasmídeo.....	27
3.9 Análise por Southern blotting do plasmídeo (Amersham Biosciences- RPN3680).....	30
3.10 Análise do plasmídeo por digestão com enzimas de restrição.....	31
3.11 Clonagem de amplicons no vetor pGEM [®] -T Easy (Promega).....	32
3.11.1 Purificação do DNA amplificado.....	32
3.11.2 Reação de ligação dos fragmentos no vetor pGEM [®] -T Easy.....	34
3.11.3 Células competentes transformadas com fragmentos ligados no vetor pGEM [®] -T Easy.....	35
3.11.4 Seleção e estoque dos clones das células transformadas.....	36
3.12 Seqüenciamento dos fragmentos do gene <i>cry3</i>	36
3.13 Análise por Southern blotting do gene <i>cry3</i>	37
3.14 Bioensaios dos isolados contra larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i>	39
3.15 Criação de <i>Sphenophorus levis</i>	40
3.16 Bioensaio contra larvas de <i>Sphenophorus levis</i> , Centro de Tecnologia Canavieira – CTC.....	41
3.17 Análise Estatística pelo teste de Tukey.....	42
4. Resultados.....	43
4.1 Análise por PCR.....	43
4.2 Caracterização do cristal parasporal da linhagem <i>londrina</i>	46
4.3 Caracterização do plasmídeo presente na linhagem <i>londrina</i>	49
4.4 Análise através da técnica de Southern blotting.....	55
4.5 Análise da seqüência de nucleotídeos do gene em estudo.....	57
4.6 Alinhamento da seqüência de aminoácidos pelo software ClustalW.....	59
4.7 Análise dos bioensaios.....	60
5. Discussão.....	62
6. Conclusões.....	70

7. Referências Bibliográficas.....	72
8. Apêndice.....	75
9. Anexo.....	76

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM GENE *cry* RECOMBINANTE DE *Bacillus thuringiensis* var. *londrina*

RESUMO -

Os países industrializados apresentam uma forte tendência em buscarem, cada vez mais, sistemas de controle biológico eficiente e específicos sendo menos tóxicos para os humanos e o ecossistema em geral. Os bioinseticidas à base de microrganismos entomopatogênicos não encontram grandes restrições quanto a sua utilização. Dentre as bactérias que possuem atividade entomopatogênica, *Bacillus thuringiensis* é a que apresenta maior valor potencial no controle dos insetos-praga, por apresentar vários genes *cry* e possuir mecanismos de recombinação genética como: conjugação e transformação. O objetivo desse estudo foi identificar e caracterizar a linhagem *B. thuringiensis* var. *londrina*. A análise morfológica dos cristais indica uma nova proteína Cry. Para comparação foram utilizadas as linhagens de *B. thuringiensis* var. *tenebrionis*, var. *tolworthi* e var. *kurstaki* - HD1 que possuem os genes *cry3Aa*, *cry3Ba* e *cry1Aa*, respectivamente. Foi realizada a extração do DNA total das quatro linhagens, em seguida esse material foi submetido à reação de PCR com os oligonucleotídeos iniciadores específicos dos genes acima citado. Para a confirmação dos resultados utilizou-se a técnica de hibridização por Southern blotting e seqüenciamento dos amplicon. O amplicon para o gene *cry3* obtido pela linhagem padrão *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* foi igual ao tamanho esperado, porém o obtido pela linhagem var. *londrina* foi maior em números de nucleotídeo que o esperado, indicando uma possível recombinação. A técnica de Southern blotting confirmou a recombinação do gene mostrando diferenças entre as bandas das linhagens padrão e da linhagem var. *londrina*, confirmando assim um novo gene *cry3*. Os bioensaios executados com esse novo gene não indicaram eficiência para alguns insetos-praga de lavoura da ordem Lepidoptera e foram eficientes para insetos-praga *Sphenophorus levis* da ordem Coleoptera. Portanto, neste trabalho foi identificado um gene *cry* recombinante, da linhagem *B. thuringiensis* var. *londrina* com toxicidade para ordem Coleoptera.

Palavras-Chave: genes *cry*, gene recombinante, proteína Cry, *Sphenophorus levis*.

IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF A RECOMBINANT GENE OF *Bacillus thuringiensis* var. *londrina*

SUMMARY –

Industrialized countries show a strong tendency to look for efficient and specific biological control systems that are less toxic to humans and ecosystems. Bioinsecticides based on entomopathogenic microorganisms are well accepted by the public. Among those, bacteria that exhibit such entomopathogenic activities, *Bacillus thuringiensis* is the one with major potential over the pests, since it harbors several *cry* genes and holds genetic recombination mechanisms such as bacterial conjugation and transformation in order to accomplish these control procedures. The aim of this research was to identify and characterize the strain of *B. thuringiensis* var. *londrina*. As a comparison some other strains of *B. thuringiensis* such as *B. thuringiensis* var. *tenebrionis*, var. *tolworthi* and var. *kurstaki* - HD1 that holds the genes *cry3Aa*, *cry3Ba* and *cry1Aa*, were used respectively. Alkaline lysis procedure was used for the DNA extraction from the four bacterial strains followed by its use on PCR reactions using the specific primers for the genes. To confirm the results were utilized the techniques of Southern blotting hybridization and DNA sequencing. The obtained amplicons have shown a difference in size considering the pattern strains compared to the var. *londrina*. The genetic recombination that took place so as to generate the var. *londrina* *cry* gene was detected by Southern blotting analysis, the hybridization results confirm the genetic recombination showing the banding pattern differences that took place generating the new *cry3* gene. The bioassays showed that the recombinant gene was efficient to control *Sphenophorus levis* (Coleopteran).

Keywords: *cry* genes, Cry protein, recombinant gene, *Sphenophorus levis*.

1. INTRODUÇÃO

Há vários anos os países industrializados têm iniciado a busca de sistemas de controle biológico menos tóxicos para os humanos e o meio ambiente em geral, de maior eficiência e especificidade. Esta tendência se acentuou nos últimos anos porque uma percentagem elevada dos pesticidas químicos de uso atual foi retirado do mercado por problemas de toxicidade e dano ecológico.

Os bioinseticidas à base de microrganismos entomopatogênicos não encontram grandes restrições quanto à sua utilização, não apresentando dificuldades quanto ao uso, podendo ser utilizados nos mesmos equipamentos projetados para a aplicação de inseticidas químicos, adaptando-se bem aos equipamentos de fermentação e desenvolvendo-se facilmente em culturas

submersas; não apresentam problemas de toxicidade ao homem aos animais e ao meio ambiente, pois, possuem alvos específicos de atuação.

Os bioinseticidas, ainda apresentam a vantagem de serem mais facilmente obtidos em larga escala sendo a fabricação menos onerosa que a dos inseticidas químicos tradicionais.

Dentre as bactérias que possuem atividade entomopatogênica, o uso do *Bacillus thuringiensis* como um bioinseticida é uma alternativa viável para o controle de insetos na agricultura e outras áreas tais como, saúde (controle de vetores de doenças). A atividade entomopatogênica desta bactéria é decorrente da produção da toxina Cry, uma inclusão protéica cristalina que a bactéria Gram-positiva produz durante o processo de esporulação. Esta proteína Cry é de alta especificidade; inofensivas ao ser humano, vertebrados, e plantas; e completamente biodegradável, portanto não levam a produção de resíduos tóxicos e cumulativos no ambiente.

Esses cristais são formados por polipeptídios conhecidos como proteínas Cry que apresentam propriedades entomopatogênicas frente a várias ordens de insetos tais, como Lepidoptera, Diptera, Coleoptera, Hemiptera e Orthoptera e outros organismos como nematóides, ácaros e protozoários.

Na forma como são sintetizadas, as proteínas Cry apresentam-se como protoxinas sem ação entomopatogênica, necessitando ser ativadas para o desencadeamento do efeito tóxico. Sua ação ocorre por via oral, ao serem ingeridas por um inseto suscetível, as protoxinas são solubilizadas no ambiente alcalino do intestino do inseto (pH ~ 10) e, processadas por proteases

específicas transformando-as em toxinas. Nas células epiteliais do intestino do inseto existem receptores específicos de membrana ocorrendo uma ligação irreversível que tem como consequência a morte da larva do inseto.

A patogenicidade e a especificidade de uma linhagem de *B. thuringiensis* são determinadas pelos tipos de genes *cry* funcionais que a mesma apresenta. Uma linhagem de *B. thuringiensis* pode conter uma ou várias cópias de um mesmo gene *cry* ou de diferentes genes cujos produtos formarão o mesmo cristal.

Existem hoje, mais de 250 seqüências de genes *cry* que foram determinadas e classificadas em 44 famílias e diferentes subclasses. Esta diferença existe pela presença do gene *cry* responsável por codificar a proteína Cry e pelos mecanismos de recombinação genética como: conjugação e transformação.

A linhagem *B. thuringiensis* var. *londrina* possui um gene recombinante semelhante ao gene *cry3Aa* presente na linhagem *tenebrionis* que produz uma proteína cristal tóxica para a ordem Coleoptera, que controla a praga *Leptinotarsa decemlineata* (besouro da batata do Colorado) (Krieg et al, 1984), que 1982 Huger isolou e Krieg identificou um novo isolado que causa morte também em *Tenebrio molitor*. A linhagem var. *londrina* é uma bactéria entomopatogênica e possui características de controle insetos-praga com atividade tóxica a um coleóptero *Sphenophorus levis* praga da lavoura de cana-de-açúcar.

Visando contribuir para a busca de alternativas mais eficazes no controle de pragas agrícolas, que sejam ecologicamente corretas, o presente trabalho teve por objetivos.

- Caracterizar molecular a linhagem *B. thuringiensis* var. *londrina*, identificar genes codificadores da proteína cristal e verificar a ação de seus produtos sobre larvas das ordens Coleoptera e Lepidoptera.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Há vários anos os países industrializados iniciaram a busca de sistemas de controle biológico menos tóxicos para os humanos e o meio ambiente em geral, de maior eficiência e especificidade. Esta tendência se acentuou nos últimos anos porque uma percentagem elevada dos pesticidas químicos de uso atual saiu do mercado por problemas de toxicidade e dano ecológico.

O aumento do uso de produtos a base de microrganismos entomopatogênicos só ocorreu, após um grande esforço dos cientistas em desenvolverem pesquisas e entenderem o funcionamento desses organismos.

Dentre as bactérias que possuem atividade entomopatogênica, o uso do *Bacillus thuringiensis* vem ganhando espaço anteriormente dedicado aos inseticidas químicos.

A descoberta e a história dessa bactéria possui mais de um século de existência e têm sido revista com detalhes (Krieg, 1986; Briggs, 1986). A história da bactéria *B. thuringiensis* começa no início do século passado quando um bacteriologista japonês isolou um *bacilo* da larva morta do bicho-da-seda, *Bombyx mori*, (Ishawata, 1901). Segundo Tanada & Kaya, 1993 descreveram já nesta época Ishawata havia localizado uma toxina que estaria relacionada com a morte das larvas (Ishawata, 1905 e 1906).

Em 1911 Berliner isolou células de uma bactéria formadora de esporos, de lagartas da espécie *Anagasta kuehniella*, uma mariposa que se desenvolve em farinha de trigo (mariposa da farinha). A partir de 1915, em homenagem à província alemã de Thuringia, de onde foi isolada, deu-se o nome de *Bacillus thuringiensis*. A mesma bactéria foi posteriormente isolada por Mattes em 1927 e desde então Berliner e Mattes relataram a patogenicidade deste tipo de bacilo para as larvas deste inseto.

De acordo com Steinhaus, 1960, Louis Pasteur pode ter trabalhado com duas espécies de *Bacillus*, sendo uma delas a própria *B. thuringiensis*, quando estudou doenças de bicho-da-seda, no período compreendido entre 1865 e 1870. Pasteur encontrou *B. thuringiensis*, na poeira de locais de criação das lagartas de bicho-da-seda. Outros pesquisadores como (Ohba et al., 1984) também isolaram numerosas subespécies da mesma bactéria de locais semelhantes, em fazendas de sericicultura do Japão.

Nenhum dos pesquisadores acima citados realizou teste de campo envolvendo a bactéria *B. thuringiensis*. A primeira tentativa foi conduzida por

(Husz, 1929) através de um programa internacional de controle da lagarta europeia do milho da espécie *Ostrinia nubilalis*. Este pesquisador obteve resultados promissores com a cultura da bactéria que havia recebido de Mattes.

Segundo Steinhaus citado por De Bach, 1969, atraiu a atenção de entomologista e de indústrias através de seus estudos básicos e aplicados que demonstravam o potencial da utilização desta espécie de bactéria como agente de controle biológico de pragas de lavouras.

A partir destes fatos as indústrias desencadearam o interesse no uso de organismos entomopatogênicos, após a publicação do trabalho de Steinhaus, 1956, citado por De Bach, 1969, sobre a viabilidade do controle de pragas utilizando-se através desta estratégia nas lavouras. As indústrias começaram a desenvolver técnicas para a produção intensiva de *B. thuringiensis*, a partir da linhagem isolada por Mattes, 1927, que foi citada como *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner de acordo com Heimpel, 1967. Essas preparações de bioinseticidas foram distribuídas para testes em grande escala contra insetos-praga suscetíveis em quase todo o mundo e foram produzidos nos Estados Unidos e em diversas regiões da Europa.

Segundo Hall, 1967, a bactéria *B. thuringiensis*, foi considerada pela indústria como o primeiro entomopatogênico a ser amplamente explorado como agente de controle biológico, devido a suas características de adaptação a um grande número de programas de controle biológicos. Além de ser específico para certos insetos-praga, não tem efeito sobre muito dos inimigos naturais. A espécie da bactéria *B. thuringiensis*, utilizada como bioinseticida não encontra

grandes restrições quanto à sua utilização, não apresenta dificuldades quanto ao uso, pode ser utilizados nos mesmos equipamentos projetados para a aplicação de inseticidas químicos, adapta-se bem aos equipamentos de fermentação e desenvolve-se facilmente em culturas submersas; não apresentam problemas de toxicidade ao homem, animais ao meio ambiente, pois, possuem alvos específicos de atuação (Moraes & Capalbo, 1986).

É este mecanismo que possibilita que insetos não prejudiciais e até descritos como benéficos às culturas de importância econômica, tais como insetos polinizadores e/ou predadores e inimigos naturais de pragas, não sejam repelidos ou prejudicados. Os bioinseticidas ainda apresentam a vantagem de serem mais facilmente obtidos em larga escala sendo suas fabricações menos onerosas que a dos inseticidas químicos tradicionais.

A espécie *B. thuringiensis* é uma bactéria Gram-positiva que tem a capacidade de produzir durante o processo de esporulação uma inclusão protéica cristalina denominada δ -endotoxina (proteínas Cry), é de alta especificidade e produz diferentes tipos de cristais (Habib & Andrade, 1998). Em meio de cultura a esporulação inicia-se na fase estacionária, no final do crescimento da forma vegetativa. O primeiro pesquisador a detectar a presença de cristais em forma de diamante em culturas esporuladas de *B. thuringiensis* foi Hannay, 1953 relacionando-os com a patogenicidade dessa bactéria.

Em 1955 Hannay & Fritz-James desenvolveram métodos para a separação e posterior análise de preparações de proteína cristal, quando obtiveram suspensões de cristais intactos, livres de outros materiais, tais como

esporos e células vegetativas. Esses tipos de cristais possuíam características de proteínas e com o estudo morfológico ao microscópio eletrônico apresentam estruturas bipiramidal. Segundo (Taylor et al., 1992; Lereclus et al., 1993; Habib & Andrade, 1998), a estrutura morfológica pode fornecer indicações sobre as atividades tóxicas dos cristais. Hoje se conhecem estruturas de cristais nas forma bipiramidal, cuboidal, romboidal, piramidal, esférica e retangular que pode estar associados às proteínas Cry, que atuam em várias ordens de insetos como: Lepidoptera, Diptera, Coleoptera, Hemíptera e Orthoptera e outros organismos como nematóides, ácaros e protozoários (de Maagd, 2003).

Segundo (Lecadet et al., 1999), a susceptibilidade do inseto-praga depende da sua habilidade em digerir as proteínas Cry (protoxinas) para que elas se tornem tóxicas, além do fato das atividades destas toxinas variarem quantitativa e qualitativamente, de acordo com a linhagem, sabe-se que as proteínas Cry apresentam massas moleculares que variam de 40 a 140 kDa, (Lecadet et al., 1999).

A patogenicidade e a especificidade de uma linhagem são determinadas pelos tipos de genes *cry* funcionais que a mesma possui. Estes genes codificam para as proteínas Cry, que são sintetizadas na forma de protoxinas. A toxicidade das mesmas está associada ao componente N-terminal, enquanto o componente C-terminal determina a formação da estrutura do cristal (LI et al., 1991). Ao serem ingeridas por um inseto susceptível, as protoxinas são solubilizadas no ambiente alcalino do intestino do mesmo (pH ~ 10) e, em seguida, são processadas por proteases específicas. Os produtos ativos das

toxinas resultantes de todos estes processos se ligam de maneira irreversível os receptores de membrana das células epiteliais do intestino do inseto, levando à formação de poros inespecíficos ou canais iônicos que alteram a permeabilidade das células. Esta alteração leva a uma lise celular e ruptura da integridade intestinal, com conseqüente morte da larva.

Existe hoje, mais de 250 seqüências de genes *cry* que foram determinadas e classificadas em 44 famílias e diferentes subclasses (Crickmore et al., 2005). Estes genes podem estar localizados tanto no cromossomo ou em grandes plasmídios (40-200 MDa) ou concomitantemente em ambos (Gonzáles et al., 1982; Lereclus et al., 1982; Sanchis et al., 1988). Sua expressão é regulada por dois mecanismos: o primeiro, depende dos fatores sigma específicos da fase de esporulação, onde está classificada a maioria dos genes *cry*, e outro independente do processo de esporulação como o gene *cry3*, cujos fatores são típicos da fase de crescimento vegetativo (Valadares-Ingliš et al., 1998).

A toxina de *B. thuringiensis* tem um tempo de permanência muito curto no meio ambiente, isto unida a uma alta especificidade tem permitido selecionar poucos insetos resistentes à sua ação inseticida. Porém, o uso constante desse inseticida pode propiciar o desenvolvimento de insetos resistentes. Para entender melhor o mecanismo de resistência (Hofmann et al., 1988), estudam as ligações de proteínas Cry purificadas e vesículas de membrana (BBMV - "Brush Border Membrane Vesicles") preparadas a partir de intestinos de larvas. Os autores verificaram que a presença de receptores para uma toxina específica de

B. thuringiensis é essencial para a toxicidade, e que, diferentes receptores para diferentes toxinas podem estar presentes. A importância dos receptores da membrana epitelial torna-se mais evidente quando se observa que nos insetos, que tornaram-se resistentes a uma ou várias toxinas, ocorreu perda da capacidade de ligação específica às toxinas, devido à perda ou modificação dos receptores no epitélio intestinal (Ferré et al., 1991; Ferré et al., 1994).

A variabilidade genética existente entre diferentes isolados de *B. thuringiensis* foi estudada principalmente através da utilização de técnicas que tem como base a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). Estas técnicas apresentam aplicações tais como a determinação da persistência da bactéria no ambiente (Bourque et al., 1993) e o efeito da atividade tóxica de uma linhagem através da determinação do conteúdo de genes *cry*, muitas vezes evidenciando a presença de genes desconhecidos e, direcionando os trabalhos de bioensaio (Carozzi et al., 1991; Kalman et al., 1993; Cerón et al., 1994; Chak et al., 1994 e Bravo et al., 1998).

A técnica da PCR tem sido ainda utilizada em combinação com a técnica de Southern Blotting onde o produto de amplificação é usado como sonda para a hibridização e o padrão de bandas obtidas, determina o tipo de genes (Southern, 1975; Shivakumar, et al., 1986 e Mullis, et al., 1993).

Vários genes responsáveis por codificar as proteínas cristais 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 mecanismo de recombinação genética tais como

conjugação e transformação sejam responsáveis pela multiplicidade dos genes *cry* (Lereclus et al., 1982; Kronstad & Whiteley, 1984) cuja dispersão, provavelmente, ocorra no meio ambiente onde este microrganismo se encontra.

Em todo mundo, muitos programas de isolamento de *B. thuringiensis* têm encontrado este microrganismo distribuído em uma ampla gama de ambientes. Linhagens de *B. thuringiensis* foram isoladas principalmente a partir de amostras de solo (Ohba e Aizawa, 1986; Martin e Travers, 1989; Aptosglou et al., 1997), de insetos vivos ou mortos (Bernhard et al., 1997; Chaufaux et al., 1997) e grãos estocados (Bernhard et al., 1997), bem como de outras fontes alternativas como do filoplano de espécies vegetais (Smith e Couche, 1991; Damgaard et al., 1998) e a partir de amostras de águas de rios e lagos (Meadows, 1993).

Devido à sua grande importância ecológica, esta bactéria é amplamente estudada, apresentando grande variabilidade genética e uma ampla gama de linhagens diferentes. No entanto quando utilizada como controle biológico o resultado permite uma tranquilidade e segurança para o meio ambiente.

Existem pragas que atacam diversas plantações em todo o mundo, assim a busca constante de controle inspira pesquisadores a não medir esforços para novos estudos e buscar um controle biológico que não prejudique o meio ambiente. Desta forma uma alternativa é descobrir genes de *B. thuringiensis* que codifiquem proteínas Cry responsáveis pelo controle destas pragas. A seguir são descritas algumas pragas que são susceptíveis à proteína Cry.

Sphenophorus levis (Coleoptera: Curculionidae), uma espécie, descrita em 1978 por (Vaurie, 1978), uma das principais pragas da cultura de cana-de-

açúcar. O gênero *Sphenophorus* ocorre em diversos países, de vários continentes, abrangendo um complexo de espécies que danificam culturas de importância econômica do grupo das gramíneas. Nos EUA ocorrem mais de 64 espécies desse gênero e várias delas são encontradas também em países da América do Sul e no Brasil, sendo descritas 14 espécies.

No estado de São Paulo, a cultura da cana-de-açúcar é bastante difundida, e a partir do ano de 1989 esta praga *S. levis* foi detectada em 14 municípios ao redor da cidade de Piracicaba-SP. Atualmente encontra-se distribuída em mais de 40 municípios do estado, incluindo as regiões: Central (Araraquara, São Carlos, Jaú); Sul (Assis, Ourinhos); Nordeste (Pradópolis) e Leste (Leme, Pirassununga, Araras, São João da Boa Vista, Santa Cruz das Palmeiras), estando, portanto, em quase todas as regiões de cultivos de cana-de-açúcar do estado de São Paulo.

Ao atacar a planta, as larvas escavam galerias e danificam os tecidos no interior das bases, causando o amarelecimento de folhas, seguido pelo secamento e morte de perfilhos. Além disso, o ataque causa redução na longevidade dos canaviais, que muitas vezes não passam do segundo corte e a redução na produtividade pode chegar a 30 toneladas de cana por hectare ao ano.

Embora seja uma praga importante, há poucos estudos sobre forma de controle. Atualmente para realizar o controle existe um conjunto de medidas, descrito por Leite et al., 2005, embora não haja nenhum produto registrado para a cultura da cana-de-açúcar pelo Ministério de Agricultura e Abastecimento.

Neste contexto podemos ressaltar a importância da continuidade de pesquisas na busca de alternativas mais eficazes no controle dessa praga, sem poluir o meio ambiente.

Spodoptera frugiperda é uma espécie com ampla distribuição nas Américas, ocorrendo preferencialmente em regiões de clima quente. No Brasil, este lepidóptero é popularmente conhecido como “lagarta-do-cartucho”, e possui o hábito de infestar e danificar as folhas jovens da cultura do milho (*Zea mays*). *S. frugiperda* é, também, freqüentemente observada em regiões com cultivo de arroz (*Oryza sativa*), para os quais é uma praga de grande importância econômica. No milho, *S. frugiperda* é considerada praga chave (Cruz, 1999).

A larva desse inseto pode atacar em todos os estádios de crescimento da cultura, assumindo grande importância no México, América Central e América do Sul. O seu ataque pode causar perdas na produção de até 38,7% (Cruz, 1995). O controle dessa lagarta tem sido realizado com inseticidas sintéticos, geralmente de custo elevado, com altos riscos de toxicidade e de contaminação ambiental.

Diante disto, este trabalho apresenta uma nova alternativa de controle biológico utilizando a bactéria *B. thuringiensis* var. *londrina* que possui um gene recombinante semelhante à bactéria *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* que ambas codificam proteínas Cry responsável para controlar os insetos-praga da ordem Coleoptera.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Linhagens bacterianas

As propriedades das linhagens que compõem este estudo estão sumariamente listadas na Tabela 1 e se apresentam com informações segundo Crickmore (1998). Estas linhagens pertencem à coleção do Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA) do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP-Campus de Jaboticabal, e estarão armazenadas na forma de esporos impregnadas em fita de papel filtro, em tubos de vidro com tampa de

rosca e com água Milli-Q estéril em temperatura controlada em BOD a 10°C permanente.

Tabela 1. Nomes das linhagens e genes utilizados neste estudo.

<i>B. thuringiensis</i>	Nome do gene	Nº acesso	Região codificada	Ordem
var. <i>kurstaki</i> -HD1	<i>Cry1Aa1</i>	M11250	527 – 4054	Lepidoptera
var. <i>londrina</i>	Em análise	_____	_____	_____
var. <i>tolworthi</i>	<i>Cry3Ba1</i>	X17123	25 - >1977 ^a	Coleoptera
var. <i>tenebrionis</i>	<i>Cry3Aa3</i>	Y00420	566 – 2497	Coleoptera

^a O símbolo > indica extensão da região codificada up ou downstream, dados da sequência conhecida.

3.2 Condições de cultivo das bactérias

Para o início dos experimentos, fitas de papel impregnadas com esporos das linhagens estudadas foram submersas em água estéril no dia anterior à repicagem, obtendo-se uma suspensão de esporos da qual foi retirada uma alíquota e estriada em placas de Petri contendo meio de cultura “Nutrient Agar” NA (extrato de carne 3g/L, peptona bacteriológica 5g/L e Ágar 15g/L) posteriormente incubadas em câmara BOD por 12 horas a 30°C.

As colônias obtidas foram inoculadas em 50 ml de caldo de infusão de cérebro e coração (BHI) Biobrás[®] e submetidas à agitação a 200 rpm em agitador orbital por 4 h e 30 min a 30°C.

3.3 Extração do DNA genômico

O material genético de cada um das linhagens foi extraído pelo protocolo de lise alcalina com algumas modificações por se tratar de amostras de bactérias Gram-positivas, as colônias isoladas das linhagens foram inoculadas em 50 ml de caldo de infusão de cérebro e coração (BHI) Biobrás[®] e submetidas sob agitação de 200 rpm em agitador orbital por 4 h e 30 min a 30°C.

As culturas bacterianas foram centrifugadas por 10 min, a 7.400 X g a 20°C, (Marmur, 1961). Os precipitados bacterianos obtidos por centrifugação pesavam em média 0,5 g, os quais foram ressuspensos em 6 ml de solução salina [0,15 M NaCl; 0,1 M EDTA (pH 8,0)], em seguida foi adicionado dodecil sulfato de sódio (SDS) 25% agitando-se suavemente a preparação e acrescentando acetato de sódio 2,5 M até a concentração final de 1M.

As desproteinizações foram feitas utilizando-se clorofórmio/álcool isoamílico (24:1v/v). Os sobrenadantes foram coletados e em seguida adicionou-se 2 volumes de etanol absoluto gelado. Os precipitados obtidos por centrifugação a 10.486 x g por 15 min a 4°C foram dissolvidos em TE [10 mM Tris HCl (pH 7,4), 1 mM EDTA]. As amostras de DNA foram precipitadas com etanol absoluto e posteriormente ressuspensos em 1 ml de TE.

As amostras contendo DNA genômico de cada linhagem foram quantificadas por espectrofotometria em equipamento Beckman[®], modelo DU 640B, medindo a absorbância em contraste com uma amostra de TE, nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm, sendo a relação 260/280 calculada. Para estimar a quantidade do DNA genômico obtido foi utilizado o padrão em que uma unidade de densidade óptica (DO) equivale a 50 µg de DNA por ml de solução (Sambrook e Russel, 2001).

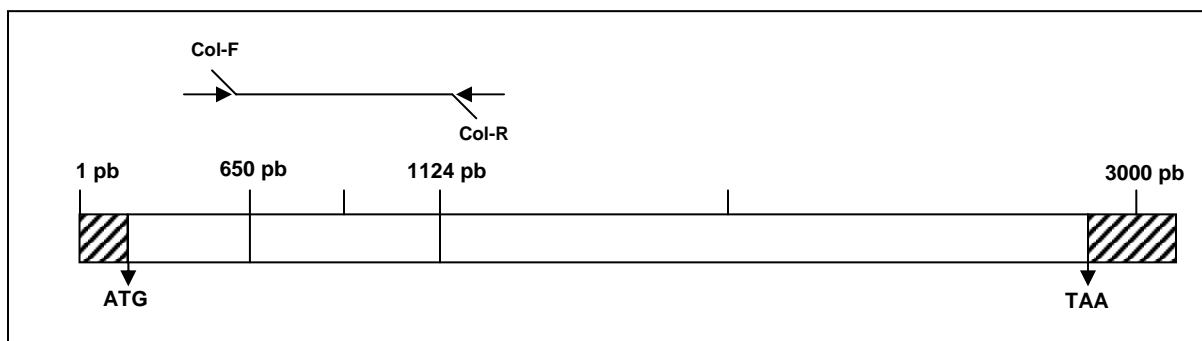
3.4 Identificação dos genes *cry3Aa* e *cry1* por PCR

Para a confirmação da presença do gene *cry3* nas linhagens deste trabalho, foi utilizado o par de oligonucleotídeos iniciadores Col-F e Col-R, produzidos tendo por base a seqüência do gene *cry3Aa3* que codifica para a proteína Cry3, típica de coleópteros (Sick, 1990), os quais foram elaborados e otimizados no LGBBA, para a linhagem de *B. thuringiensis* var. *tenebrionis*, por Davolos (2005) (Comunicação pessoal). Além dos oligonucleotídeos iniciadores descritos acima foram utilizados também o par de oligonucleotídeos iniciadores *gral-cry1-1* e *gral-cry1-2* descritos por Bravo, et al. (1998), que detecta a classe geral do gene *cry1*. As seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores estão descritas na tabela 2. A figura 1 mostra o diagrama representativo do tamanho e da região do gene que foi amplificado com o par de oligonucleotídeos iniciadores Col-F e Col-R.

Tabela 2. Oligonucleotídeos iniciadores gerais para o gene *cry1* e gene *cry3Aa3*.

Oligonucleotídeos iniciadores	Seqüências do gene
gral- <i>cry1</i> -1	5'CTGGATTTACAGGTGGGGATAT3'(d)
gral- <i>cry1</i> -2	5'TGAGTCGCTTCGCATATTTGACT3'(r)
Col-F	5'AATAATGAGGTGCCAACTAAC3'(d)
Col-R	5'AATAAATGTGTGTTGGCAG3'(r)

Seqüências de oligonucleotídeos usado na amplificação da reação de PCR.

**Figura 1.** Diagrama representativo dos oligonucleotídeos iniciadores Col-F e Col-R região que amplifica o gene *cry3Aa3*.

As reações de amplificação para o par de oligonucleotídeos iniciadores descritos foram conduzidas em um volume de 20 μ l contendo: 20 ng de DNA molde, 250 μ M de uma solução de dNTPs; 2,0 mM de $MgCl_2$; 0,4 μ M de cada iniciador; 1,0 U da enzima Taq DNA polimerase (GIBCO-BRL[®]); solução tampão para a reação de PCR e água Milli-Q previamente esterilizada (qsp 20 μ l). Em

todos os lotes de reação realizou-se um controle negativo no qual a quantidade de DNA foi substituída por água Milli-Q, previamente esterilizada.

As reações de amplificação foram realizadas em aparelho termociclador (PTC-100 “Programmable Thermal Controller” - MJ Research, Inc.[®]), equipado com circuito “Hot Bonnet”, onde foram utilizados os programas descritos a seguir. Para o par de oligonucleotídeos iniciadores geral *gral-cry1* o programa constitui de um passo único de desnaturação de 5 min a 95°C e 31 ciclos consistindo de um ciclo de desnaturação a 95°C por 1 min; pareamento a 50°C por 1 min e extensão a 72°C por 1 min; extensão final a 72°C por 5 min. Para o par de oligonucleotídeos iniciadores Col-F e Col-R o programa utilizado conteve passo único de desnaturação de 5 min a 95°C e 31 ciclos consistindo de um ciclo de desnaturação a 95°C por 1 min; pareamento a 35°C por 1 min e extensão a 72°C por 1 min; extensão final a 72°C por 5 min. Ao fim do programa foi adicionado um passo único para a manutenção da amostra a 13°C até a retirada dos tubos do termociclador.

Após as amplificações, adicionaram-se 2 µl de tampão de amostra (“loading buffer” - 0,5% de azul de bromofenol em glicerol 50%) às amostras. Um volume de 15 µl de cada amostra foi aplicado em gel de agarose a 1,0%, contendo brometo de etídeo (0,5 µg/ml) e submetido à eletroforese horizontal por 2 h a uma corrente elétrica de 70 V, conduzida em tampão TEB 1X (Tris 89 mM, EDTA 2,5 mM e Acido Bórico 89 mM com pH 8,3), também adicionado brometo de etídeo (0,5 µg/ml). Em todas as eletroforeses realizadas foi adotado o emprego de uma amostra de DNA com fragmentos de tamanhos conhecidos,

múltiplos de 1kb “1kb Plus DNA ladder”, produzida pela INVITROGEN®, a qual serviu como referência de migração eletroforética para verificação dos tamanhos dos fragmentos que foram obtidos nas reações de amplificação.

Os géis de agarose foram visualizados sob luz UV e foto documentados em equipamento fotodocumentador (GEL DOC2000 - Bio-Rad®), através do software Quantity-one.

3.5 Purificação de cristais

A linhagem *Bacillus thuringiensis* var. *londrina* foi mantida no meio Ágar Nutriente (NA) e incubada a 30°C por 96 h até atingir a fase de esporulação. Para análise da proteína cristal. A purificação foi feita por ultracentrifugação com gradiente de sacarose descontínua conforme (Juárez-Pérez et al., 2002; Ragni et al., 1996).

3.6 Análise morfológica da proteína por microscopia eletrônica de varredura

A análise morfológica dos cristais foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (Shivakumar, 1996), a suspensão de cristais da linhagem *londrina* foi preparada em liofilizador Labconco, modelo Lyphlock 18. A seguir, a amostra foi depositada sobre suportes metálicos e coberta com ouro por 180 s, utilizando

metalizador Emitech, modelo K550 e observadas em microscópio eletrônico de varredura Zeiss, modelo DSM 962.

3.7 Separação de DNA plasmidial e cromossomal por gradiente de cloreto de céσιο

Para a realização do perfil plasmidial, a linhagem *Bacillus thuringiensis* var. *londrina* foi submetida a uma nova extração de DNA pelo protocolo de Marmur, 1961. A amostra contendo DNA genômico da linhagem foi quantificada por espectrofotometria em espectrofotômetro Beckman[®], modelo DU 640B, medindo a absorvância em contraste com uma amostra de TE [10 mM Tris HCl (pH 7,4), 1 mM EDTA], nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm, sendo a relação 260/280 calculada. Para estimar a quantidade da amostra de DNA obtida, foi utilizado um padrão em que uma unidade de densidade óptica (DO) equivale a 50 µg de DNA por ml de solução (Sambrook e Russel, 2001).

Após a extração do DNA genômico, adicionou-se 840 µl de água Milli-Q estéril, 160 µl de solução de brometo de etídeo (10 mg/ ml) em água, completando assim 2 ml de solução. Em seguida foi adicionado ao volume 1g/ml de cloreto de céσιο (CsCl₂) sólido a 30°C para facilitar a dissolução, o que deu origem a uma solução de DNA/cloreto de céσιο. A densidade final da solução foi de 1,55 g/ ml e a concentração de brometo de etídeo deve se aproximar a 740 µg/ ml.

Em seguida as amostras foram colocadas em tubos plásticos de ultracentrifuga “Beckman TL-100” e centrifugados em um rotor TLA-100.3 a 264000 x g por 20 h a 20°C. Nestas circunstâncias ocorreu a separação do DNA cromossomal e DNA plasmidial, o que permitiu a visualização através de luz ultravioleta à presença de duas bandas, sendo a superior o DNA cromossomal e a inferior o DNA plasmidial.

Após a coleta foram realizadas lavagens para a retirada do brometo de etídeo e do cloreto de céσιο. Estas foram realizadas da seguinte maneira: um volume de N-butanol 1 saturado com álcool isoamílico foi adicionado, misturado em agitador do tipo ‘vortex’ por 5 s e submetidos a centrifugação por 3 min, a 239 X g à temperatura de 25°C; este procedimento foi repetido por três vezes. Após esta etapa uma nova lavagem foi realizada com o objetivo de retirar todo o cloreto de céσιο presente na amostra; para a realização da mesma foram adicionados 3 volumes de água Milli-Q estéril e 2 volumes de etanol absoluto a 4°C. As amostras foram centrifugadas por 5 min a 10621 X g a uma temperatura de 4°C, em seguida o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em 200 µl de TE [10 mM Tris HCl (pH 7,4), 1 mM EDTA], (Sambrook e Russel, 2001).

3.8 Identificação da presença do gene *cry3* no plasmídeo

As amostras contendo DNA plasmidial da linhagem foi quantificada por espectrofotometria em espectrofotômetro Beckman®, modelo DU 640B, medindo a absorvância em contraste com uma amostra de TE, nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm, sendo a relação 260/280 calculada. Para estimar a quantidade do DNA total obtido foi utilizado o padrão em que uma unidade de densidade óptica (DO) equivale a 50 µg de DNA por ml de solução (Sambrook e Russel, 2001). A amostra foi diluída numa concentração de 10 ng/µl, para a realização das amplificações.

As reações de amplificação para o par de oligonucleotídeos iniciadores, Col-F (5' – AAT AAT GAG GTG CCA ACT AAC – 3') e Col –R (5' – AAT AAA TGT GTG TTG GCA G – 3') foram conduzidas em um volume de 20 µl contendo: 20 ng de DNA molde plasmidial, 250 µM de uma solução de dNTPs; 2,0 mM de MgCl₂ ; 0,4 µM de cada iniciador; 1,0 U da enzima Taq DNA polimerase (GIBCO-BRL®); solução tampão para a reação de PCR e água Milli-Q previamente esterilizada (q.s.p. 20 µl). Em todas as reações realizou-se um controle negativo no qual a quantidade de DNA foi substituída por água Milli-Q, previamente esterilizada.

As reações de amplificação foram realizadas em aparelho termociclador (PTC-100), onde foram utilizados os seguintes programas. O programa utilizado conteve passo único de desnaturação de 5 min a 95°C e 31 ciclos consistindo de um ciclo de desnaturação a 95°C por 1 min; pareamento a 35°C por 1 min e

extensão a 72°C por 1 min; extensão final a 72°C por 5 min. Ao fim do programa foi adicionado um passo único para a manutenção da amostra a 13°C até a retirada dos tubos do termociclador.

Após as amplificações, adicionaram-se 2 µl de tampão de amostra (“loading buffer” - 0,5% de azul de bromofenol em glicerol 50%) às amostras. Um volume de 15 µl de cada amostra foi aplicado em gel de agarose a 1,0%, contendo brometo de etídeo (0,5 µg/ml) e submetido à eletroforese horizontal por 2 h a uma corrente elétrica de 70 V, conduzida em tampão TEB 1X (Tris 89 mM, EDTA 2,5 mM e Acido Bórico 89 mM com pH 8,3), também adicionado brometo de etídeo (0,5 µg/ml).

Em todas as eletroforeses realizadas foi adotado o emprego de uma amostra de DNA com fragmentos de tamanhos conhecidos, múltiplos de 1kb “1kb Plus DNA ladder”, produzida pela INVITROGEN®, a qual serviu como referência de migração eletroforética para verificação dos tamanhos dos fragmentos que foram obtidos nas reações de amplificação.

Os géis de agarose foram visualizados sob luz UV e foto documentados em equipamento fotodocumentador (GEL DOC2000 - Bio-Rad®), através do software Quantity-One.

3.9 Análise por Southern blotting do plasmídio (Amersham Biosciences- RPN3680)

O DNA plasmidial após ser separado por ultracentrifugação foi submetido ao processo de nebulização, visando realizar uma quebra mecânica do mesmo, de forma gerar um “smear” (fragmentos de vários tamanhos).

A amostra de DNA plasmidial foi conduzida em um volume total de 2 ml contendo: 25,5 µg de DNA plasmidial; 50 mM de Tris HCl pH 8,0; 15 mM de MgCl₂ e 25% de glicerol esterilizado a 50% e água Milli-Q previamente esterilizada (q.s.p. para 2 ml), a solução foi submetida a uma pressão de 3 kgf/cm² com nitrogênio em um tempo de 1 min, todo esse processo foi feito em gelo e a solução foi colocada dentro de uma câmara de nebulização, após esse processo com auxílio de micropipetas aliquotou-se 5 µl da solução nebulizada e adicionaram-se 2 µl de tampão de amostra (“loading buffer” - 0,5% de azul de bromofenol em glicerol 50%) às amostras. Um volume de 7 µl de cada amostra foi aplicado em gel de agarose a 1,0%, contendo brometo de etídeo (0,5 µg/ml) e submetido à eletroforese horizontal por 2 h tensão elétrica ou diferença de potencial (ddp), de 70 V, conduzida em tampão TEB 1X (Tris 89 mM, EDTA 2,5 mM e Acido Bórico 89 mM com pH 8,3), também adicionado brometo de etídeo (0,5 µg/ml).

O gel de agarose foi visualizado sob luz UV e foto documentados em equipamento fotodocumentador (GEL DOC2000 - Bio-Rad®), através do software Quantity-One.

A transferência do gel ocorreu por capilaridade em uma membrana de náilon carregada positivamente Hybond-N⁺ (Amersham Biosciences) e as hibridizações foram executadas conforme o protocolo descrito na literatura (Southern E. M. 1975; Shivakumar A. G., 1986; Sambrook e Russel, 2001). O fragmento de DNA amplificado da linhagem *londrina* pela técnica de PCR foi usado como sonda fria em uma concentração 70 ng/μl, feita a partir do “Gene Images™ AlkPhos Direct™ labelling and detection system” (Amersham Biosciences code n° RPN # 3690) que é baseado no sistema quimiluminescência dioxetane com o reagente de detecção quimiluminescência “CDP-Star™”, conforme as instruções do fabricante.

3.10 Análise do plasmideo por digestão com enzimas de restrição

As digestões das amostras de DNA plasmidial com as enzimas de restrição do tipo I *EcoRI* e *MboI*, foram realizadas em um volume total de 20,0 μl, contendo 780 ng do DNA plasmidial, 10% do volume total da reação de tampão específico para cada enzima, 10 U de cada enzima de restrição e completando o volume total com água Milli-Q estéril. As reações foram

incubadas a 37°C durante 4 h em aparelho termociclador (PTC-100 MJ Research, Inc.[®]), equipado com circuito “Hot Bonnet”.

Posteriormente, um volume de 10 µl de cada amostra foi aplicado em gel de agarose a 1,0%, contendo brometo de etídeo (0,5 µg/ml) e submetido à eletroforese horizontal por 2 h a uma corrente elétrica de 60 V, conduzida em tampão TEB 1X (Tris 89 mM, EDTA 2,5 mM e Acido Bórico 89 mM com pH 8,3), também adicionado brometo de etídeo (0,5 µg/ml).

Foi adotado o emprego de uma amostra de DNA com fragmentos de tamanhos conhecidos, múltiplos de 1kb “1kb DNA ladder[®]”, produzida pela INVITROGEN[®], a qual serviu como referência de migração eletroforética para verificação dos tamanhos dos fragmentos que foram obtidos nas reações de restrição.

O gel de agarose foi visualizado sob luz UV e foto documentados em equipamento fotodocumentador (GEL DOC2000 - Bio-Rad[®]), através do software Quantity-One.

3.11 Clonagem de amplicons no vetor pGEM[®]-T Easy (Promega)

3.11.1 Purificação do DNA amplificado

Após a reação de PCR, os produtos de amplificação do gene *cry3Aa3* das linhagens *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* e var. *londrina* foram purificados por eletroforese preparativa e eluição em gel de agarose. A eluição do fragmento

correspondente será realizada em 10 reações de PCR com volume final de 20 μ L cada, totalizando um volume de 200 μ l de reação para cada amostra. Em seguida, serão adicionados 20 μ l de tampão de carregamento (azul de bromofenol) às amostras, separadas por gel de agarose de baixo ponto de fusão, sem brometo de etídio no gel e no tampão, durante 1,5 h, a 100 V constantes.

Após a eletroforese, as canaletas correspondentes ao padrão molecular e às alíquotas das respectivas amostras foram separadas do gel e coradas com brometo de etídio (0,5 μ g/ml), durante 10 min. As bandas contendo os fragmentos foram visualizadas em luz UV e a região foi marcada: os fragmentos do gel corados foram unidos ao gel preparativo e a região correspondente ao fragmento de PCR foi cortada para a eluição deste.

A região cortada do gel foi colocada em microtubos e a elas foram adicionados NaCl 1M (30 μ l/mg de gel). A mistura foi aquecida a 65°C durante aproximadamente 10 min para solubilização do gel. Um volume de fenol foi adicionado aos microtubos e agitados no “vortex” por 2 min. Os microtubos foram centrifugados a 3220 x g durante 10 min em temperatura ambiente em seguida a fase superior foi coletada e transferida para novos microtubos.

Novamente, um volume de fenol foi adicionado e repetido a fase anterior, após a coleta da fase aquosa superior foi adicionada um volume de clorofórmio, os tubos agitados em “vortex” por 2 min e em seguida centrifugados. Após a coleta do sobrenadante foi adicionados 10 % do volume de acetato de sódio 3 M, pH 6,8 e isopropanol na mesma proporção (sobrenadante mais o

acetato de sódio) e a suspensão incubada por 12 h a -20°C para precipitação dos fragmentos de PCR purificados do gel.

Após essa incubação foi realizada nova centrifugação a $3220 \times g$ a 4°C por 30 min; o sobrenadante foi descartado e os microtubos secos por 5 min a temperatura ambiente.

Os resíduos obtidos foram lavados com 1ml de etanol 70% por centrifugação a $3220 \times g$ a 4°C por 15 min, e os sobrenadantes descartados. Os microtubos foram novamente secos durante 30 min no fluxo laminar. Após esse período o DNA foi ressuspendido em água filtrada permanecendo durante 12 h na geladeira para homogeneizar.

Uma alíquota de $2 \mu\text{l}$ do fragmento eluído e purificado foi submetido à eletroforese como descrito anteriormente para quantificação do material.

3.11.2 Reação de ligação dos fragmentos no vetor pGEM[®]-T Easy

Os fragmentos da PCR purificados foram clonados no vetor pGEM[®]-T Easy (Promega–catálogo nº catálogo # A3610), conforme as instruções do fabricante. As reações de ligação foram realizadas da seguinte maneira: $1 \mu\text{l}$ de tampão de ligação rápida T4 DNA ligase 1X (30 mM Tris-HCl, pH 7,8); 10 mM MgCl_2 ; 10 mM DTT; 1 mM ATP; pGEM[®]-T Easy (50 ng); T4 DNA ligase (3 U); Produto da PCR (225 ng); Água Milli-Q esterilizada por filtração para completar o volume final de $10 \mu\text{l}$. A reação permaneceu a 4°C por 16 h.

Foi usado um controle positivo contendo DNA do inserto (fornecido pelo fabricante) e um controle negativo sem a presença de inserto de DNA, para determinar a eficiência da ligação. As reações foram homogeneizadas e incubadas durante a noite num termociclador à temperatura constante de 4°C, para obtenção de uma maior eficiência de ligação.

3.11.3 Células competentes transformadas com fragmentos ligados no vetor pGEM[®]-T Easy

As células competentes de *Escherichia coli* DH10B foram removidas do freezer -80°C e descongeladas em gelo por aproximadamente 30 min antes de serem utilizadas. As células (200 µl) foram depositadas cuidadosamente em um tubo de 1,5 ml junto com 10 µl do vetor obtido pela ligação. Todos os tubos foram mantidos em gelo por 20 min e em seguida colocados em banho-maria a 42°C por 90 s e imediatamente recolocados em gelo por 2 min.

Após esse processo a solução célula/vetor foi transferida para tubos “Falcon” com capacidade de 15 ml estéreis, adicionado 1ml de meio SOC e incubado por 1 h a 37°C, com agitação de 180 rpm em agitador orbital. O meio SOC foi preparado do seguinte modo: 20 g de triptona, 5 g de extrato de levedura, 0,5 g de NaCl e 0,19 g de KCl em 1000 ml de água destilada Milli-Q em pH 7,0. Autoclavado a 120°C, por 20 min. Após esse processo adicionou-se

ao meio uma solução de 2% de glicose 1 M e 1% de $MgCl_2$ 1 M, esterilizada por filtração.

Placas de Petri com meio LB (10 g/L de triptona, 5 g/L de extrato de levedura; 10 g/L de NaCl; 10 g/L de agar, pH 7) e com Ampicilina, esterilizada por filtração, com a concentração final de 50 $\mu\text{g/ml}$ foram produzidas. Após a solidificação do meio, 100 μl de 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside (X-GAL) em 5% de dimetilformamida foi espalhada sobre a superfície das placas com o auxílio de uma alça de Drigalski esterilizada.

Após incubação das células transformadas em meio SOC, 100 μl de cada cultura foram espalhadas nas placas de petri com o meio LB. As placas foram incubadas a 37°C por 16 h e, após este período, foi realizada a seleção das colônias brancas (células transformadas).

3.11.4 Seleção e estoque dos clones das células transformadas

Os clones coletados com palitos esterilizados, foram cultivados em microplacas de 96 poços com 110 μL de meio CG (CircleGrow, B10101) e Ampicilina (50 mg/ml) durante 22 h, a 37°C. Após esse período, a cada clone cultivado foi adicionado 150 μl de glicerol 40% para estoque e armazenado no freezer -80°C.

3.12 Seqüenciamento dos fragmentos do gene *cry3*

Os DNAs plasmidiais dos clones foram isolados por miniprep (Sambrook e Russel, 2001). O seqüenciamento parcial do gene *cry3* de cada clone foi realizado usando 0,4 μ L DNA Sequencing-Big Dye Terminator Cycle Sequencing-Ready ABI Prism (Version 3); 3,2 pmols T7 Promoter Primer; 100 ng do DNA plasmidial, 4,6 μ l de tampão (400mM Tris-HCl, pH 9; 10mM MgCl₂); e água Milli-Q) para um volume de 10 μ L. As reações foram incubadas em um termociclador com um programa que contém passo único de desnaturação de 2 min a 96°C e 40 ciclos consistindo de um ciclo de desnaturação a 96°C por 10 segundos; pareamento a 52°C por 20 segundos e extensão a 60°C por 4 min. Ao fim do programa foi adicionado um passo único para a manutenção da amostra a 10°C até a retirada das microplacas do termociclador. Os amplicons foram seqüenciados usando o seqüenciador capilar modelo ABI 3700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

Para a verificação da qualidade das seqüências geradas foi utilizado o programa “Sequencing Analysis 3.4” (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) que gerou eletroferogramas. Estes foram então submetidos à análise dos conjuntos de programas “Phred (Ewing, B. et al., 1998) Phrap (<http://bozeman.mbt.washington.edu/phrap.docs/phrap.html>) e Consed” (Gordon et al., 1998). A seleção das seqüências foi realizada através do programa Contgen com nível mínimo de exigência de 400 bases e com qualidade Phred acima de 20. Posteriormente as seqüências foram submetidas

à consulta de similaridade de nucleotídeos, com as seqüências depositadas no banco de dados do GenBank acessado através do NCBI (National Center for Biotechnology Information). O programa utilizado para a consulta foi o Blast - "Basic Local Alignment Search Tools (Altschul et al. 1997). As seqüências foram alinhadas pelo software CLUSTAW v.1.81 (Thompson et al., 1997).

3.13 Análise por Southern blotting do gene *cry3*

As amostras dos DNAs genômico das linhagens *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*, var. *tolworthi*, var. *londrina* e var. *kurstaki*-HD1 foram submetidas a digestão com a enzima de restrição *Mbol*, neste caso, as reações apresentaram um volume de 20,0 µl, contendo 980 ng do DNA genômico, 10% do volume total da reação de tampão específico da enzima, 10 U da enzima de restrição e completando o volume total com água Milli-Q estéril. As reações foram incubadas a 37°C durante 4 h em aparelho termociclador (PTC-100 - MJ Research, Inc.[®]), equipado com circuito "Hot Bonnet".

Posteriormente, um volume de 10 µl de cada amostra foi aplicado em gel de agarose a 1,0%, contendo brometo de etídeo (0,5 µg/ml) e submetido à eletroforese horizontal por 2 h a uma corrente elétrica de 60 V, conduzida em tampão TAE 1X (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM com pH 8,3), também adicionado brometo de etídeo (0,5 µg/ml).

Foi adotado o emprego de uma amostra de DNA com fragmentos de tamanhos conhecidos, múltiplos de 1kb “1kb DNA ladder[®]”, produzida pela INVITROGEN[®], a qual serviu como referência de migração eletroforética para verificação dos tamanhos dos fragmentos que foram obtidos nas reações de restrição.

O gel de agarose foi visualizado sob luz UV e foto documentados em equipamento fotodocumentador (GEL DOC2000 - Bio-Rad[®]), através do software Quantity-One.

A transferência do gel ocorreu por capilaridade em uma membrana de náilon carregada positivamente Hybond-N⁺ (Amersham Biosciences) e as hibridizações foram executadas conforme o protocolo descrito na literatura (Southern E. M. 1975; Shivakumar A. G., 1986; Sambrook e Russel, 2001). O fragmento de DNA amplificado da linhagem var. *londrina* pela técnica de PCR foi usado como sonda fria em uma concentração 70 ng/μl, feita a partir do “Gene Images[™] AlkPhos Direct[™] labelling and detection system” (Amersham Biosciences code n° RPN # 3690) que é baseado no sistema quimiluminescência dioxetane com o reagente de detecção quimiluminescência “CDP-Star[™]”, conforme as instruções do fabricante.

3.14 Bioensaios dos isolados contra larvas de *Spodoptera frugiperda*

Para o preparo da suspensão esporos/cristais, utilizada na inoculação da dieta artificial semi-sólida (Barreto et al, 1999), oferecida às larvas de

Spodoptera frugiperda, as linhagens descritas na tabela 1, foram colocadas em placas de Petri com meio de cultura “Nutrinet Agar” NA (extrato de carne 3g/L, peptona bacteriológica 5g/L e Agar 15g/L) e incubadas a 30°C por 96 h (4 dias), de modo a atingirem a completa esporulação. Com o auxílio de uma alça de platina todo o conteúdo da placa de Petri foi coletado.

O conteúdo bacteriano de uma única placa, que representou o material de uma única linhagem de *B. thuringiensis*, foi colocado em tubo “Falcon” com 15,0 ml de capacidade estéreis, contendo 10,0 ml de água destilada esterilizada Milli-Q e 1% de TWEEN-20 (espalhante adesivo). Depois de completar a homogeneização em aparelho do tipo “vortex”, os esporos foram diluídos e quantificados por ml da suspensão, por meio de leitura em câmara de Neubauer, de modo que ficassem padronizados a uma concentração de $1,25 \times 10^9$ esporos/ml (Barreto et al., 1999).

A suspensão de esporos/cristais de cada linhagem foi incorporada a dietas artificial, e posteriormente vertidas em tubos de ensaios de fundo chato. Após a completa solidificação da dieta as larvas do 3° instar de idade de *S. frugiperda*, foram cuidadosamente depositadas nos tubos.

Após a transferência estas foram levadas para a sala de criação, para o desenvolvimento das larvas. Realizou-se, também, mais um controle negativo (testemunha), no qual foi adicionada apenas água esterilizada a dieta.

Os bioensaios foram realizados com 50 larvas por tratamento sendo cada larva foi considerada uma repetição. As avaliações de mortalidade e peso foram realizadas no décimo quinto dia após a exposição da larva à dieta tratada.

O mesmo foi feito com as larvas *Anticarsia gemmatalis*, *Plutella xylostella* e *Phaedon cochleariae* a única diferença são as dietas que foram modificadas para cada inseto (Hoffmann-Campo et al., 1985; Medeiros et al., 2003; Girard and Jouanin, 1999).

3.15 Criação de *Sphenophorus levis*

A criação de *S. levis* utilizada encontra-se mantida no Centro Tecnológico Canavieiro (CTC) em Piracicaba-SP. A sala de criação apresenta as seguintes condições: temperatura ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade relativa do ar ($70 \pm 10\%$) e luminosidade (14 h de luz: 10 h de escuro). A dieta para o desenvolvimento das larvas *S. levis* segue descrita no anexo 1.

3.16 Bioensaio contra larvas de *Sphenophorus levis*, Centro de tecnologia Canavieira – CTC

Para o preparo da suspensão esporos/cristais, utilizada na inoculação da dieta artificial, oferecida às larvas de *S. levis*, as linhagens descritas na tabela 1. foram colocadas em placas de Petri com meio de cultura “Nutrinet Agar” NA (extrato de carne 3g/L, peptona bacteriológica 5g/L e Agar 15g/L) e incubados a

30°C por 96 h (4 dias), de modo a atingirem a completa esporulação. Com o auxílio de uma alça de platina todo o conteúdo da placa de Petri foi coletado.

O conteúdo bacteriano de cada placa, que representou o material de uma única linhagem de *B. thuringiensis*, foi colocado em tubo esterilizado “Falcon” com 15,0 ml de capacidade, contendo 10,0 ml de água destilada esterilizada Milli-Q e 1% de TWEEN-20 (espalhante adesivo). Depois de completar a homogeneização em agitador elétrico de tubo “vortex”, os esporos foram diluídos e quantificados por ml da suspensão, por meio de leitura em câmara de Neubauer, de modo que ficassem padronizados a uma concentração de $1,25 \times 10^9$ esporos/ml (Barreto et al., 1999).

A suspensão de esporos/cristais de cada linhagem foi incorporada a dietas artificial, e posteriormente vertidas em tubos de ensaios de fundo chato. Após a completa solidificação da dieta as larvas do oitavo dia de idade de *S. levis*, foram cuidadosamente depositadas nos tubos.

Após a transferência estas foram levadas para a sala de criação que apresentava as condições adequadas (temperatura $25^\circ\text{C} \pm 2$, umidade relativa do ar 70% e luminosidade 14 h de luz: 10 h de escuro), para o desenvolvimento das larvas. Realizou-se, também, mais um controle negativo (testemunha), no qual foi adicionada apenas água esterilizada a dieta.

Os bioensaios foram realizados com 50 larvas por tratamento sendo cada larva foi considerada como uma repetição. As avaliações de mortalidade e peso foram realizadas no décimo quinto dia após a exposição da larva à dieta tratada.

3.17 Análise Estatística pelo teste de Tukey

O delineamento experimental inteiramente casualizado foi constituído de cinco tratamentos e uma repetição, com 50 larvas. Dentre os cinco tratamentos utilizados, 3 foram compostos pelas linhagens padrão de *B. thuringiensis* var. *tenebrionis*, *B. thuringiensis* var. *tolworthi* e *B. thuringiensis* var. *kurstaki* – HD1, um foi representado pela linhagem *B. thuringiensis* var. *londrina* e o outro constituiu-se da testemunha, no qual utilizou-se água.

As avaliações dos parâmetros mortalidade, em percentagem, e peso das larvas, em gramas, foram realizadas 15 dias após a exposição das mesmas a dieta tratada. O peso médio final das larvas, em gramas, foi submetido ao teste de Tukey com nível de 5% de significância, pelo software ESTAT.

4. RESULTADOS

4.1 Análise por PCR

O DNA genômico da linhagem *B. thuringiensis* var. *londrina* e das linhagens padrão *B. thuringiensis* var. *tenebrionis*, var. *tolworthi* e var. *kurstaki* – HD1 foram utilizados nos ensaios de PCR, para assegurar a presença ou a ausência do gene *cry1* e *cry3Aa3* no genoma destas bactérias. A figura 2 mostra uma reação de amplificação otimizada utilizando o par de oligonucleotídeos iniciadores Col-F e Col-R usando as linhagens *B. thuringiensis* var. *londrina* e var. *tenebrionis*. As linhagens *B. thuringiensis* padrão citadas no parágrafo anterior foram usadas como controle positivo para ordem Lepidoptera e

Coleoptera, através das reações com os pares de oligonucleotídeos iniciadores *gral-cry1* e Col-F e Col-R respectivamente. Para a linhagem *B. thuringiensis* var. *londrina* o par de oligonucleotídeos iniciadores *gral-cry1*, que detecta genes da classe *cry1* com atividade de toxicidade para ordem Lepidoptera não apresentou amplificação indicando a ausência do gene nessa bactéria. Por outro lado à reação com o par de oligonucleotídeos iniciadores Col-F e Col-R, que detecta o gene *cry3Aa3* resultou na produção de um amplicon com o número maior de nucleotídeos quando comparado ao fragmento obtido com o DNA da linhagem *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* (figura 2). Nas linhagens padrão de *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* e var. *tolworthi* houve amplificação com bandas diferentes da linhagem *londrina*, já na linhagem *kurstaki* – HD1 não apresentou nenhum tipo de amplificação (figura 3).

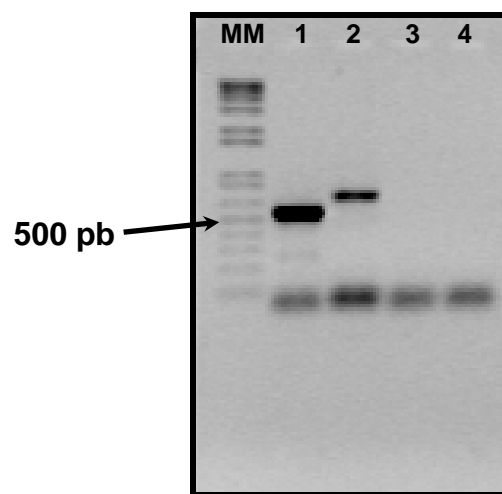


Figura 2. O eletroforograma da amplificação: otimização do par de oligonucleotídeos iniciadores Col-F e Col-R que amplifica o gene *cry3Aa3*, onde a canaleta 1 contém material da linhagem padrão var. *tenebrionis*, a canaleta 2 da linhagem *londrina*, canaleta 3 da linhagem padrão var. *kurstaki*-HD1 e na canaleta 4 controle negativo da reação. MM: 1 kb Plus DNA ladder[®].

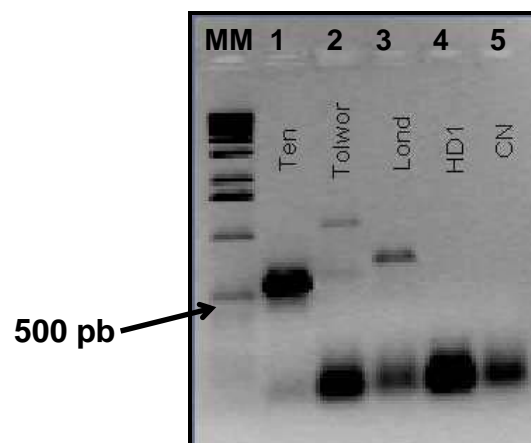


Figura 3. O eletroforograma das amplificações: amplificações geradas pelo par de oligonucleotídeos iniciadores Col-F e Col-R que amplifica o gene *cry3Aa3*, onde a canaleta 1 contém material da linhagem padrão var. *tenebrionis*, a canaleta 2 da linhagem var. *tolworthi*, canaleta 3 da linhagem *londrina*, canaleta 4 da linhagem padrão var. *kurstaki*-HD1, e na canaleta 5 o controle negativo da reação. MM: 1 kb Plus DNA ladder®.

4.2 Caracterização do cristal parasporal da linhagem *londrina*

As linhagens padrão *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1, var. *tolworthi* e var. *kenya* apresentam cristais na forma de inclusões cuboidais, a var. *aizawai* na forma de cristais bipiramidais, a var. *tenebrionis* cristais romboidais e há linhagens que apresentam cristais no formato redondo, como observado nas figuras abaixo: 4, 5 e 6, sendo que esses cristais possuem atividades tóxicas às ordens: Lepidoptera, Diptera e Coleoptera, respectivamente. A linhagem *B. thuringiensis* var. *londrina* produz cristais com formato diferente, que não se encaixa em nenhum tipo de cristais já descrito na literatura. Quando comparado com os cristais cubóide, bipiramidal, redondo e rombóide, os cristais produzidos apresentam em geral uma base quadrada com um dos lados em forma de pirâmide, como mostra a figura 7.

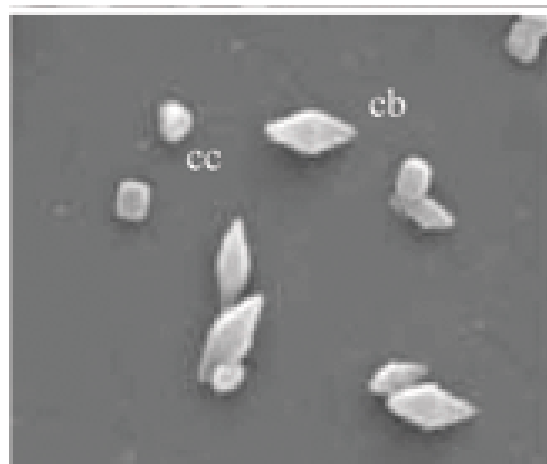


Figura 4. Microscopia eletrônica de varredura do complexo esporo-cristal: cb: cristal bipiramidal; cc: cristal cubóide (aumento de 10.000x).

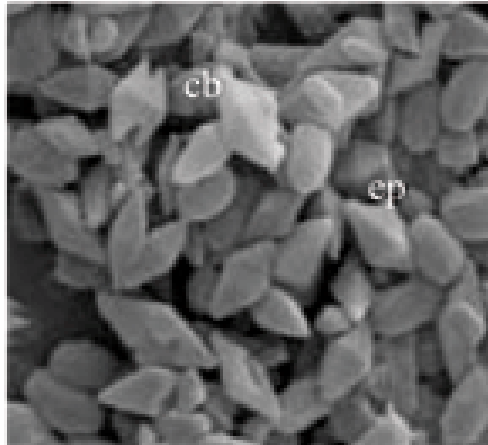


Figura 5. Microscopia eletrônica de varredura do complexo esporo-cristal: ep: esporo; cb: cristal bipiramidal (aumento de 10.000x).

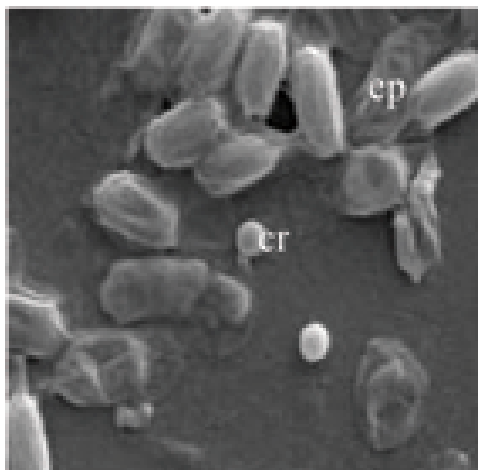


Figura 6. Microscopia eletrônica de varredura do complexo esporo-cristal: ep: esporo; cr: cristal redondo (aumento de 10.000x).



Figura 7. Microscopia eletrônica de varredura do cristal da linhagem *londrina* (visto em aumento de 10.000 x e 20.000 x)
Barra: indica 1,0 μm

4.3 Caracterização do plasmídeo presente na linhagem *londrina*

A linhagem de *B. thuringiensis* var. *londrina* possui um plasmídeo com tamanho superior a 14 kb conforme observado após a purificação por gradiente de cloreto de cério contendo brometo de etídio por ultracentrifugação (Sambrook and Russel, 2001). A figura 7 mostra quatro tubos de ultracentrifuga, em cada um dos tubos está contido o material genético, separado por ultracentrifugação pelo gradiente de cloreto de cério e corado por brometo de etídio das linhagens de *B. thuringiensis* var. *tenebrionis*, *kurstaki*-HD1, *londrina* e *E. coli* DH10B.

Nos tubos 1 e 2 onde estão o material genético das linhagens de *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* e *kurstaki*-HD1, apresenta apenas uma única banda, no tubo 3, este se encontra com o material genético da linhagens de *B. thuringiensis* var. *londrina*, apresenta duas bandas em posições diferentes, sendo uma na parte superior do tubo e a outra abaixo, indicando material cromossomal e plasmidial.

O tubo 4 contém material genético da Bactéria *E. coli* DH10B, onde essa bactéria não possui DNA plasmidial, apresentando uma única banda. Essa banda serve como controle do DNA cromossomal.

Após essa etapa, o material genético foi submetido a uma separação eletroforética em gel de agarose a 1%, onde se pode verificar a presença de um plasmídeo (que ocorre formando concatâmeros), como pode ser observado na figura 9.

O material plasmidial foi utilizado para restrição com a enzima *EcoRI*, onde através da eletroforese em gel de agarose 1% se identificou três bandas com números de pares de bases diferentes (figura 10); na análise deste elemento genético foi observada a ocorrência de sítios de restrição da enzima *EcoRI*.

Através desses dados pode ser calculado o tamanho do plasmideo em pares de bases. Fazendo-se uso desse material plasmidial purificado, foram realizados os experimentos de amplificação com os oligonucleotídeos iniciadores Col-F e Col-R gerado da seqüência do gene *cry3Aa3* para definir nele a presença ou ausência do gene que codifica a proteína Cry.

A figura 10 mostra o produto de amplificação gerado com o par de oligonucleotídeos iniciadores Col-F e Col-R para o DNA total e plasmidial das linhagens de *B. thuringiensis var. tenebrionis* e *var. londrina*. O produto de amplificação mostra números de pares de bases diferentes para as reações com o DNA total, tendo a linhagem *londrina* com um número maior de pares de bases.

Por outro lado a amplificação com o par de oligonucleotídeos iniciadores Col-F e Col-R ao DNA plasmidial mostra a não presença de bandas, indicando a ausência do gene no plasmideo.

A técnica de Southern blotting foi necessária para definir a localização do gene *cry* em estudo, como mostra a figura 12 não há presença de hibridização no material genético plasmidial, só ocorrendo à hibridização no material genético total.

A figura 13 indica uma digestão com as enzimas de restrição *EcoRI* e *Mbol* no material genético da linhagem de *B. thuringiensis* var. *londrina* onde se observou um “smear” no DNA total.

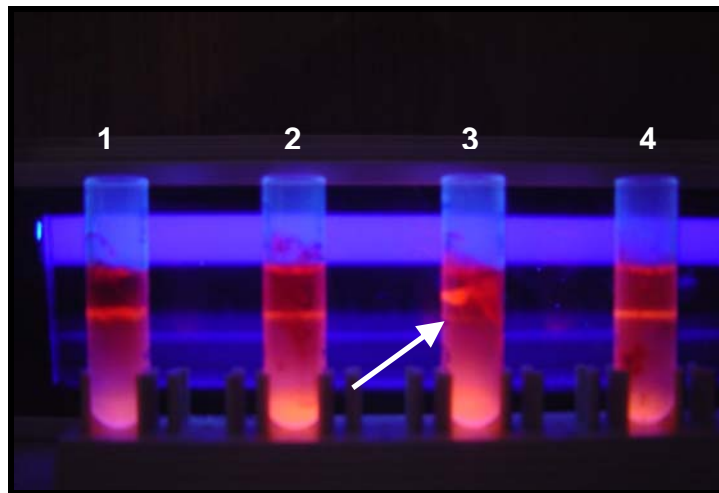


Figura 8. Purificação por ultracentrifugação: onde tubo 1 contém o material genético da linhagem padrão var. *tenebrionis*, tubo 2 da linhagem padrão var. *kurstaki*-HD1, tubo 3 da linhagem *londrina*, tubo 4 da bactéria *E. coli* DH10B controle. Seta indica: banda inferior.

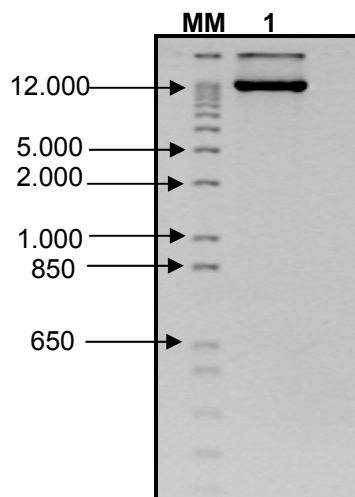


Figura 9. Eletroforese com material genético plasmidial: forma de concatâmero; da linhagem *B. thuringiensis* var. *londrina*. MM: 1kb Plus DNA ladder®. A seta indica aproximadamente 14 kb.

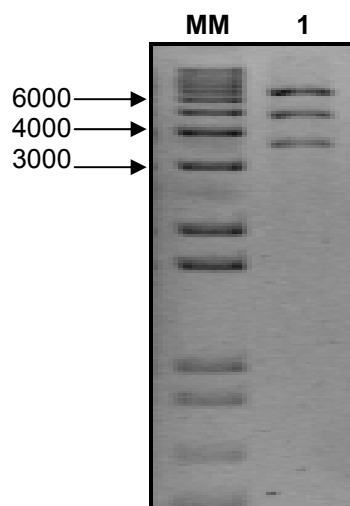


Figura 10. Eletroforese da digestão do material genético plasmidial da linhagem *B. thurigneisnsis* var. *londrina* pela enzima de restrição *EcoRI* (canaleta 1), apresentando três bandas distintas. MM: 1kb Plus DNA ladder.

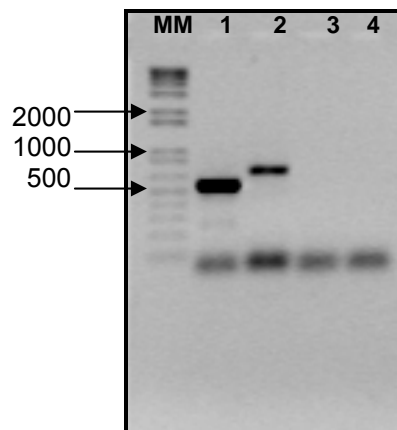


Figura 11. Eletroforese da amplificação com o par de oligonucleotídeos iniciadores col-F e col-R. Canaleta 1- amplicon *B. thuringiensis* var. *tenebrionis*, canaleta 2- amplicon *B. thuringiensis* var. *londrina*, canaleta 3- material plasmidial da linhagem *B. thuringiensis* var. *londrina*, canaleta 4- controle negativo da reação. MM: 1kb Plus DNA ladder.

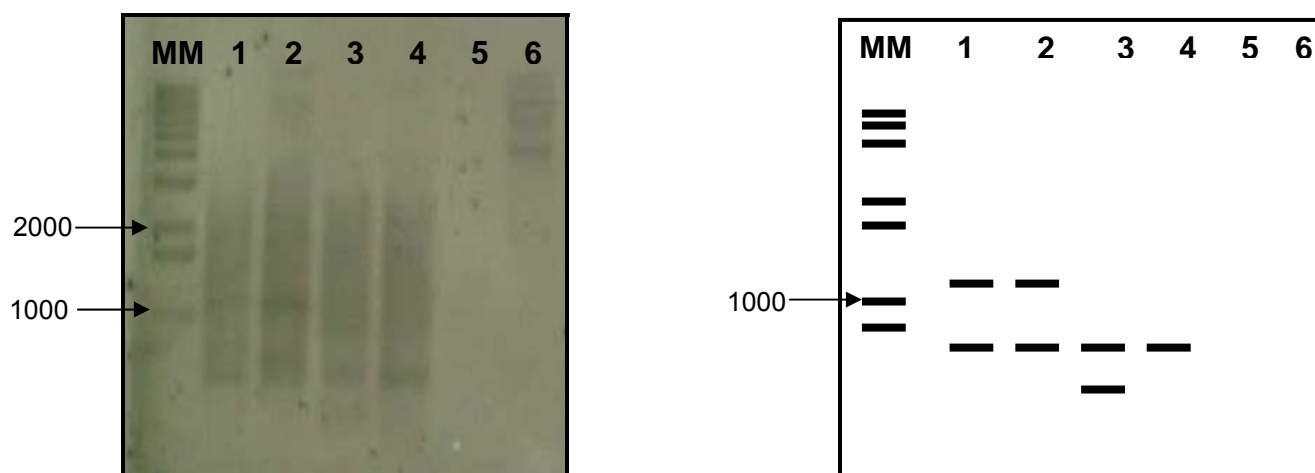


Figura 12. A técnica de Southern blotting: na canaleta 1 *B. thuringiensis* var. *tenebrionis*, na canaleta 2 *B. thuringiensis* var. *tolworthi*, na canaleta 3 *B. thuringiensis* var. *londrina*, na canaleta 4 *B. thuringiensis* var. *kurstaki*-HD1, na canaleta 5 material plasmidial da linhagem *londrina*, na canaleta 6 DNA de lambda. MM: 1kb plus DNA ladder.

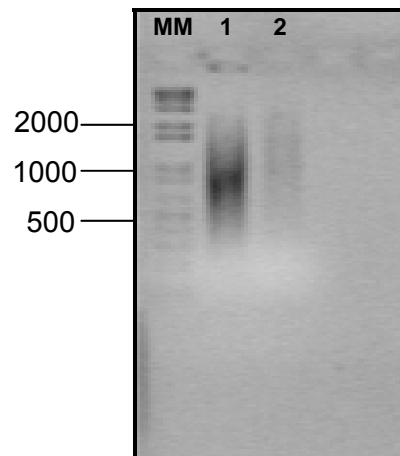


Figura 13. Eletroforese: canaleta 1 digestão com a enzima de restrição *EcoRI* no DNA genômico da linhagem de *B. thuringiensis* var. *londrina*, canaleta 2 digestão com a enzima de restrição *MboI* no DNA genômico da linhagem de *B. thuringiensis* var. *londrina*.
MM: 1kb Plus DNA ladder.

4.4 Análise através da técnica de Southern blotting

Após análise por PCR, foi constatada a diferença do produto amplificado pelo par de oligonucleotídeos iniciadores Col-F e Col-R da linhagem de *B. thuringiensis* var. *londrina* com as linhagens padrão *tenebrionis*, *tolworthi*, *londrina* e *kurstaki* – HD1. A técnica de Southern blotting pode mostrar a diferença do produto amplificado nela ocorrido em relação a linhagens padrão.

A linhagem de *B. thuringiensis* var. *londrina* apresenta uma hibridização semelhante ao gene *cry3Aa3*, como mostra a figura 14. Foi utilizado como uma sonda o produto amplificado da linhagem de *B. thuringiensis* var. *londrina* que apresentou maior número de pares de bases na amplificação.

O DNA genômico das linhagens *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*, var. *tolworthi* e var. *kurstaki*–HD1 foram utilizados como controle positivo e negativo da hibridização para verificar a diferença do gene. Esses DNAs genômico foram digeridos com a enzima de restrição *Mbol* para gerar um “smear”, após essa digestão executou o blotting passando o material digerido para a membrana de náilon, iniciando a hibridização com a sonda do produto amplificado a linhagem estudada *londrina*.

A figura 14 ilustra o resultado da hibridização através do Southern blotting com uma banda monomórfica e outras bandas em posições diferentes, indicando que são genes diferentes da classe *cry1* e *cry3*; sendo de outras subclasses, isso mostra que a linhagem de *B. thuringiensis* var. *londrina*

apresenta bandas da linhagem padrão var. *kurstaki*-HD1 e bandas que não ocorre em linhagens padrão var. *tenebrionis* e var. *tolworthi*.

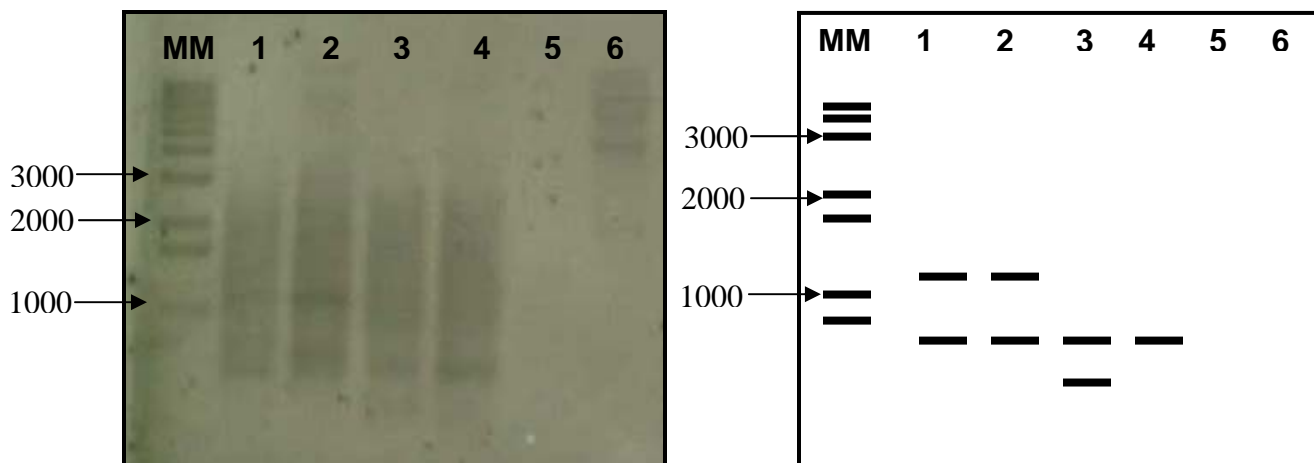


Figura 14. A técnica de southern blotting: na canaleta 1, 2, 3, e 4 houve a hibridização com DNA genômico digerido com *Mbol*, das linhagens *tenebrionis*, *tolworthi*, *londrina* e *kurstaki*-HD1 respectivamente, a diferença de bandas está na linhagem da canaleta 3, gene recombinante. MM: 1 Kb DNA ladder. A seta indica 1000 pb.

4.5 Análise da seqüência de nucleotídeos do gene em estudo

Além da técnica de Southern blotting houve o cuidado em verificar a homologia entre a seqüência de nucleotídeos do produto amplificado pela PCR.

O fragmento de amplificação da linhagem *londrina* que apresentou maior número de pares de bases maiores do que o esperado foi clonado, após a extração do material plasmidial dos clones, este foi submetido novamente a PCR (figura 15) para executar o seqüenciamento como mostra a figura 16.

Assim, obtendo a seqüência de nucleotídeos do gene *cry*, foi gerado o alinhamento comparando a homologia entre os genes das linhagens padrão var. *kurstaki*-HD1 (GenBank acesso # M11250) e var. *tenebrionis* (GenBank acesso # Y00420) e var. *tolworthi* (GenBank acesso # X17123) pelo software clustalW que indica uma baixa homologia entre os nucleotídeos da linhagem *londrina*.

As seqüências de aminoácidos codificados pelos genes das linhagens padrão acima citadas mostram uma baixa homologia entre elas, na figura 15 mostra a região das seqüências de aminoácidos que ocorre o alinhamento comparando entre esses genes *cry* que codificam a proteína Cry. O alinhamento de um fragmento de 252 aminoácidos da linhagem de *B. thuringiensis* var. *londrina* mostra que ocorre o alinhamento com as linhagens padrão *tenebrionis*, *tolworthi* e *kurstaki*-HD1, em regiões próximas, mas com uma baixa homologia. Os aminoácidos que não fazem parte dessa região não indicam nenhuma homologia com as seqüências de aminoácidos das linhagens padrão.

Esse resultado mostra que essa linhagem bacteriana indica possível patogenicidade para larvas de *S. levis* da ordem Coleoptera e possui potencial de controle por possuir um gene recombinante.

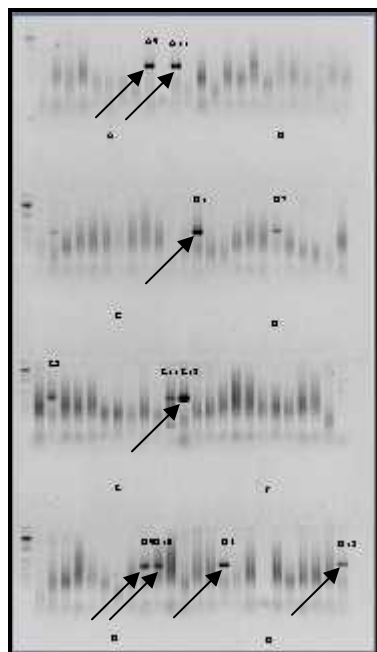


Figura 15. Eletroforese da extração do material plasmidial: as setas indicam o produto de clonagem no vetor pGEM[®]-T Easy e clones da células *E. coli* DH10B transformada.

4.6 Alinhamento da seqüência de aminoácidos pelo software ClustalW

```

tenebrionis      NTEALDSSTTKDVIQKGISVVGDLLGVVGFPPFGALVSFYTNFLNTIWPSE-DPWKAFME
111
tolworthi       STEVLDSSTVKDAVGTGISVVGQILGVVGVPPFAGALTSFYQSFLNAIWPSDADPWKAFMA
120
kurstaki        TPIDISLSLTQFLLSEFVPGAGFVLGLVDIIWG-----IFGPSQ---WDAFPV
78
londrina        -----VNEMKV 6
                  . :

tenebrionis     QVEALMDQKIADYAKNKALAELOGLQNNVEDYVSALSSWQKNPVSSRNPHSQGRIRELFS
171
tolworthi      QVEVLIDKKIEEYAKSKALAELOGLQNNFEDYVNALDSWKKAPVNLRSRRSQDRIRELFS
180
kurstaki       QIEQLINQRIEEFARNQAISRLEGLSNLYQIYAESFREWEADPTN---PALREEMRIQFN
135
londrina       VVGSKNKTQVAVEKVVKDAEITSLSVXGVSAPFSDEE-----TMQGAIN
53
                  : . : : : : . * . . . : : : : : : : : : : : : : :

tenebrionis     QAESHFRNSMPSFAISGYEVLFLTTYQAANTHLFLLKDAQIYGEEWGYEKEDIAEFYKR
231
tolworthi      QAESHFRNSMPSFAVSKFEVLFLPTYQAANTHLLLKDAQVFGEEWGYSSEDIAEFYQR
240
kurstaki       DMNSALTTAIPLLAVQNYQVPLLSVYVQAANLHLSVLRDVSVFGQRWGFDAATINSRYND
195
londrina       RAKRALENEMKVVVGS-----KNKTKVG-----
76
                  : : . : . . . : : *

tenebrionis     QLKLTQEYTDHCVKWYNVGLDKLRGSSYESWVNFNRYRREMTLTVLDLIALFPLYDVRLY
291
tolworthi      QLKLTQQYTDHCVNWNVGLNSLRGSTYDAWVKFNRFREMTLTVLDLIVLFPFYDVRLY
300
kurstaki       LTRLIGNYTDYAVRWYNTGLERVWGPDSRDWVRYNQFRELTTLVLDIVALFSNYDSRRY
255
londrina       -----AVEKVV-----KDAEITSLSVPGVAQPFSD---
101
                  . : : : : : : : : : : : : : :

tenebrionis     PKEVKTELTRDVLTDPIVGVNLRGYGTTFSNIENYIRKPHLFDYLHRIQFHTRFPQGY
351
tolworthi      SKGVKTELTRDIFTDPIFTLNALQEYGPFFSSIENSIRKPHLFDYLRGIEFHTRLRPGYS
360
kurstaki       PIRTVSQLTREIYTNPVLEN-FDGSFRGMAQRIEQNIRQPHLMDILNSITIYTDVHRG--
312
londrina       -----EETMQGAINRAKRALEE-----
118
                  . . : : : :

tenebrionis     GNDSFNYWSGNYVSTRPSIGSNDIITSPFYGNK-SSEPQNLEFNGEKVYRAVANTNLAV
410
tolworthi      GKDSFNYWSGNYVETRPSIGSNDTITSPFYGDK-SIEPIQKLSFDGQKVYRTIANTDIAA
419
kurstaki       ----FNYWSGHQITASPVGFSGPEFAFPLFGNAGNAAPPVLVSLTGLGIFRTLSSPLYRR
368
londrina       -----GEAPIGIGLEG-GVMKTEHGLFMCN
142
                  . : : * : : : .

```

```

tenebrionis      WP-SAVYSGVTKVEFSQYNDQTDEASTQTYDSKRNVGAV-SWDSIDQLPPETTDEPLEKG
468
tolworthi       FPDGKIYFGVTKVDFSQYDDQKNETSTQTYDSKRYNGYLGAQDSIDQLPPETTDEPLEKA
479
kurstaki        IILGSGPN--NQELFVLDGTEFSFASLTTLNLPSTIYRQRTVDSLVDVIPPQDNSVPPRAG
426
londrina        WG-----ALXTSDGKXFVAGXXRITLPXX-----FLXPLEXGXELEGA
180
                .           .           : * . . .

tenebrionis      YSHQLNYVMCFLMQG---SRGTIPVLTWTHKSVDFNMFIDSKKITQLPLVKAYKLQSGAS
525
tolworthi       YSHQLNYAECFLMQD---RRGTIPFFTWTHRSVDFNFNTIDAEEKITQLPVVKAYALSSGAS
536
kurstaki        FSHRLSHVTMLSQAAGAVYTLRAPTFWQHRSAEFNNIIPSSQITQIPLTKSTNLGSGTS
486
londrina        IGIGLEGGVMKTEHG-----LFMCNWGALTS DGKFVAGRITLPFLPLEGELXXXMXXX
233
                . * .           . * : :           : . : * :

tenebrionis      VVAGPRFTGGDIIQCTENG-SAATIIYVTP-DVSYSQYRARIHYASTSQITFTLSLDGAP
583
tolworthi       IIEGPGFTGGNLLFLKESSNSIAKFKVTLNSAALLQRYRVRIRYASTTNLRLFVQNSNND
596
kurstaki        VVKGPGFTGGDILRRTSPG--QISTLRVNITAPLSQRYRVRIRYASTTNLQFHTSIDGRP
544
londrina        XX-----XXDIMDI-----
242
                : : :

```

Figura 16. Alinhamento dos aminoácidos pelo Software ClustalW entre as linhagens *B. thuringiensis* var. *tenebrionis*, var. *tolworthi*, var. *kurstaki* - HD1 e var. *londrina*.

4.7 Análise dos bioensaios.

Os bioensaios conduzidos com as larvas das pragas pertencentes à ordem Lepidoptera: *Plutella xylostella*, *Anticarsia gemmatalis*, *Spodoptera frugiperda* e Coleoptera: *Phaedon cochleariae* mostraram que a linhagem bacteriana *B. thuringiensis* var. *londrina* não apresentou atividade tóxica.

Para a praga *Sphenophorus levis* (Coleoptera) a linhagem *B. thuringiensis* var. *londrina*, que possui um gene recombinante, indicou atividade tóxica. Embora a mortalidade de larvas tenha sido baixa (12%) o resultado mostra que essa linhagem bacteriana é patogênica para larvas de *S. levis* e possui potencial de controle. O resultado mais satisfatório foi observado em relação ao desenvolvimento das larvas, pois foi possível verificar que após o tratamento com as linhagens *B. thuringiensis* var. *tenebrionis*, var. *tolworthi* e var. *londrina* ocorreram os menores pesos médios das larvas após o tratamento, ou seja, essas linhagens bacterianas interferiram no desenvolvimento larval causando redução (Tabela 3) .

Na tabela 3 o resultado do teste Tukey é apresentado resumidamente, onde foram atribuídas letras iguais para médias semelhantes e letras distintas para as médias que diferem entre si.

Tabela 3. Mortalidade e Peso Médio em gramas de larvas de *Sphenophorus levis* após os tratamentos.

Tratamentos	Peso Médio Final (g)	Mortalidade (%)
Controle negativo	0.1586 ¹ a	0.0
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> - HD1	0.1476 ab	17.5
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>londrina</i>	0.1300 abc	12.0
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>tolworthi</i>	0.1218 bc	12.0
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>tenebrionis</i>	0.1031 c	17.5

¹ Médias seguidas de mesma letra, na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho realizado com a bactéria de *B.*

thuringiensis var. *londrina* evidenciaram que:

- os cristais produzidos por esta linhagem apresentam um formato incomum;
- esta linhagem possui um único plasmideo com 14 kb de tamanho;
- esta linhagem não apresenta gene *cry* no único plasmideo detectado;
- seu único gene *cry* parece estar presente apenas no cromossomo;
- o produto de amplificação obtido pela linhagem *londrina* é maior em número de nucleotídeos quando comparado com o controle positivo, *tenebrionis*;
- tendo em vista várias evidências observadas neste trabalho é possível inferir que o gene *cry* em descrição apresente-se como uma forma recombinante;

- foi detectada estatisticamente atividade tóxica contra as larvas de *Sphenophorus levis*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRUP, L., J. DAMGAARD, AND K. WASSERMAN. Mobilization of small plasmids in *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* is accompanied by specific aggregation. **Journal Bacteriology**. v.175, p. 6530-6536, 1993.

APTOSGLOU, S. G.; et al., Distribution and characterization of *Bacillus thuringiensis* in the environment of the olive in Greece. **Microbiológica**. v.20, p.69-76, 1997.

ARONSON A. I., HAN, E.; MCGAUGHEY, W. and JOHNSON. D. The Solubility of Inclusion Protein from *Bacillus thuringiensis* Is Dependent upon Protoxin Composition and Is a factor in Toxicity to Insects. **Applied Environmental Microbiology**. v.57, p.981-986, 1991.

BARRETO M. R. Atividade inseticida do sobrenadante da cultura de cepa de *Bacillus thuringiensis* Berliner contra lagartas de *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae). **An. Soc. Entomol. Brasil**. v.28, p.675-685, 1999.

BRAVO, A., ARABIA, S.; LOPEZ, S. 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 Environmental Microbiology**. v.64, p.4965-4972, 1998.

BRIGGS, M. R., KADONAGA, J. T., BELL, S. P., TJIAN, R. Purification and biochemical characterization of the promoter-specific transcription factor, Sp1; **Science**. v.3, p.47-52, 1986.

BERLINER, E. Ueber die Schlattsucht der Mehlmottenraupe. Z Gesamte Getreidewesenm. v.25, p.3160-3162, 1911.

BERNHARD, K.; JARRET, P.; MEADOWS, M. Natural isolates of *Bacillus thuringiensis*: worldwide distribution, characterization, and activity against insects pests. **Journal of Invertebrate Pathology**. v.70, n.1 p.59-68, 1997.

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

CARROZZI, N.B.et al. Prediction of inseticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polimerase chain eaction product profiles. **Applied Environmental Microbiology**. Whasington, v. 57, p.3057 3061, 1991.

ClustalW WWW Service at the European Bioinformatics Institute <http://www.ebi.ac.uk/clustalw>. Rodrigo Lopez, Services Program. Acessado em 10 de julho de 2006.

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

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

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

CHAUFAUX, J. ET AL, Recherche de souches naturelles du *Bacillus thuringiensis* dans différents biotopes, à travers le monde. **Canada Journal Microbiology**. v.43, p.337-343, 1997.

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

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

CRICKMORE N., ZEIGLER D. R., E. SCHNEPF, J. VAN RIE, D. LERECLUS, J. BAUM, A. BRAVO, AND D. H. DEAN. 2005. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature [online]
http://www.biols.susx.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/index.html. acessado em 15 junho de 2006.

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

CRUZ, I.; OLIVEIRA, L.J.; OLIVEIRA, A.C.; VASCONCELOS, C.A. Efeito do nível de saturação de alumínio em solo ácido sobre os danos de *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH) em milho. **Sociedade Entomológica do Brasil**. v.25, p. 293-297, 1996.

CRUZ, I., FIGUEIREDO, M. L. C., A. C., VASCONCELOS, C. A. Damage of *Spodoptera frugiperda* (Smith) in different maize genotypes cultivated in soil under three levels of aluminium saturation. **International Journal of Pest Management**. v.45, n.4, p.293-296.1999

DAMGAARD, P. H. Natural occurrence and dispersal of *Bacillus thuringiensis* in the environment. In: CHARLES, J. F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LE ROUX. C. (Ed.). Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application. Netherlands Klumer **Academia Publishers**. p.23-40, 1998.

De Bach, P. 1969 Control biológico de las plagas de insectos y malas hierbas. 2ª Edición, México, **Compañía Editorial Continental S/A**, 37 p.

De Maagd R., A. Bravo, C. Berry, N. Crickmore, and H. E. Schnepf. Structure, diversity and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. **Annual Review Genetic**. v.37, p.409-433, 2003.

EWING, B. et al. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**. v. 8, p. 175-185, 1998.

FERRÉ, J.; REAL, M.D.; VAN RIE, J.; JANSSENS, S.; PEFEROEN, M. Resistance to *the Bacillus thuringiensis* bioinsecticide in a field population of

Plutella xylostella is due to a change in a midgut membrane receptor. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 88, p. 5119-5123, 1991.

FERRÉ, J.; ESCRICHE, B.; BEL, Y.; VAN RIE, J. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins. **FEMS Microbiology Letter**. v.132, p.1-7, 1994.

GIRARD, C. JOUANIN, L. Molecular cloning of cDNAs encoding a range of digestive enzymes from a phytophagous beetle, *Phaedon cochleariae*. *Insect Biochem Mol Biol*, 1999. v.29, n.12, p.1129-1142.

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

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**. v.8, p.195-202, 1998.

Habib M. E. M., C. F. S. Andrade. Bactérias entomopatogênicas. 383-446. *In* S. B. Alves. (ed). **Controle microbiano de Insetos**. Piracicaba, Fealq, 1998.

Hall, I. M. Some fundamental aspects of applied insect pathology. **Advance Pest Contr.** v.4, p.13-24, 1967.

Hannay, C. L. Crystalline inclusions in aerobic spore-forming bacteria. **Nature London**. v.172, p.1004-1005, 1953.

Hannay, C. L. & Fritz-James, P. C. The protein Crystal of *Bacillus thuringiensis* (BERLINER, 1951). **Canada Journal Microbiology**. v.1, p.694-710, 1955.

Heimpel, A. M. A critical review of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* (BERLINER, 1915) and other crystalliferous bacteria. **Annual Review Entomopathol.** v.12, p.287-329, 1967.

HOFMANN, C.; VANDERBRUGGEN, H.; HÖFTE, H.; VAN RIE, J.; JANSENS, S.; VAN MELLAERT, H. Specificity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.85, p.7844-7848, 1988.

HOFFMAN-CAMPO, C.B.; OLIVEIRA, E.B. de; MOSCARDI, F. Criação massal da lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatalis*). Londrina: Embrapa-CNPSO, 1985. 14p. (Embrapa-CNPSO. Documentos, 10).

HÖFTE, H., SEURINCK, J.; VAN HOUTVEN, A.; and VAECK, M. Nucleotide sequence of a gene encoding an insecticidal protein of *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* toxic against Coleoptera. **Nucleic Acids Research.** v.15, p.71-83, 1987.

HÖFTE H., VAN RIE, J.; JANSENS, S.; VAN HOUTVEN, A.; VANDERBRUGGEN, H. and VAECK, M. Monoclonal antibody analysis and insecticidal spectrum of three types of lepidopteran-specific insecticidal crystal protein of *Bacillus thuringiensis*. **Applied Environmental Microbiology.** v.54, p.242-255, 1988.

HÖFTE H., and WHITELEY H. R. Insecticidal Crystal Proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiology Review.** v.53, p.242-255, 1989.

HUGER, A. M.; KRIEG, A.; LANGENBRUCH, G. A. and SCHNETTER, W. Discovery of a new strain of *Bacillus thuringiensis* effective against Coleoptera. In Symposium in Memoriam Dr. Ernst Nerliner anlässlich des 75. Jahrestages der Erstbeschreibung von *Bacillus thuringiensis* (Eds. A. Krieg and A. M. Huger) **Mitt. Biol. Bundesanstalt Land-u. Forstwirtschaft**, Berlin-Dahlem, v. 333, p.83-96, 1982.

HUSZ, B. On the use of *Bacillus thuringiensis* in the fight against the corn borer. **Inst. Corn Borer Invest. Sci. Rep.** v.2, p.99-110, 1929.

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

ISHAWATA, S. On Sotto Bacillus. **Dainihon Sanshi Kaiho.** v.160, p.24-28, 1905.

ISHAWATA, S. Investigations on Sotto Bacillus. **Kyoto Sangyo Koshujo Sanji Hokoku.** v.160, p.24-28, 1906.

JUÁREZ-PÉREZ V., GUERCHICOFF, A.; RUBINSTEIN, C. and DELÉCLUSE, A. Characterization of Cyt2Bc Toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *medelin.* **Applied Environmental Microbiology.** v.68, p.1228-1231, 2002.

KALMAN ET, S. et al. Cloning of a novel *cryIC*-type gene from a strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *galleriae.* **Applied Environmental Microbiology.** v.59, p.1131-1137, 1993.

KRIEG, A.; HUGER, A.M.; LANGENBRUCH, G.A.; SCHNETTER, W. Neue Ergebnisse über *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* unter besonderer Berücksichtigung seiner Wirkung auf den Kartoffelkäfer (*Leptinotarsa decemlineata*). **Anz. Schädlingskde.** Pflanzenschutz. v.57, p.145-150, 1984.

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

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

LECADET , M.M.; DE BANJAC, H. *Bacillus thuringiensis* bete exotoxin. In: Davidson, F.W., ed. Pathogenesis of Invertebrate Microbial Diseases. New Jersey, **Totowa Publ.** p.293-321, 1999.

LEITE, L. G.; MACHADO, L. A.; BATISTA FILHO, A. Potencial para produção e uso de nematóides entomopatogênicos para o controle de pragas e necessidade de pesquisas no brasil. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 8., São Pedro, 2005. Livro de Resumos. São Pedro: SEB, 2005. p.51.

LERECLUS, D. et al.; A transposon-like structure related to the delta-endotoxin gene in *Bacillus thurigneisnsis*. **EMBO Journal**, v.3, p.2561-2567, 1982.

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

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

MARTIN, P.A.W.; TRAVERS, R.S. Worldwide abundance and distribution of *B. thuringiensis* isolates. **Applied Environmental Microbiology**. v.55, p. 2437-2442, 1989.

MATTES, O. Parasitre Krankheiten der Mehlmottenlaven und Versuche ber ihre Verwendbarkeit als biologisches. Ges. Berford. **Gesamte Naturwiss.** Marburg. v.62, p.381-417,1927.

MEADOWS, M. P. *Bacillus thuringiensis* in the environment: ecology and risk assessment. In: ENTWISTLE, P. F.; CORY, J. S.; BAILEY, M. J.; HIGGS, S. (Ed). *Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticida: **theory and practice**. Chichester: john wiley, p.193-220, 1993.

MEDEIROS P. T., DIAS J.M.S.C.; MONNEARAT R.G., SOUZA N. R. Instalação e manutenção de criação massal de traça-das-crucíferas (*Plutella xylostella*). Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003. 4p. (Circulara técnica, 29).

MORAES, I. O. & CAPALBO, D. M. F. Producao de bacterias entomopatogênicas. In: Batista Alves, S. ed. **Controle Microbiano de Insetos**, Piraicaba, ed. Manole Ltda, 1986, p.152-155, 1984.

MULLIS, K. B. The unusual origin ot the polymerase chain reaction. **Sci. Am.** V.262, p.56-65,1993.

OHBA, M.; AIZAWA, K.; SUDO, S. Distribution of *Bacillus thuringiensis* in sericultural faros of Fukuoka Prefecture, Japan. **Proc. Assoc. Plant Prot.** (Kyshu). v.30, p.152-155, 1984.

OHBA, M.; AIZAWA, K. Distribution of *Bacillus thuringiensis* in soils of Japan. **Journal of Invertebrate Pathology.** v.47, n.3, p. 277-282, 1986.

RAGNI, A.; THIÉRY, I.; and DELÉCLUSE, A. Characterization of six highly mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* strains that do not belong to H-14 serotype. **Current Microbiology.** v.32, p.48-54, 1996.

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

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

SHIVAKUMAR A. G., GUNDLING, G. J.; BENSON, T. A.; CASUTO, D.; MILLER, M. F. and SPEAR, B. B. Vegetative Expression of the δ -Endotoxin Genes of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in *Bacillus subtilis*. **Journal Bacteriology**. v.166, p.194-204, 1996.

SICK A., GAERTNER, F. and WONG. A. Nucleotide sequence of a coleopteran-active toxin gene from a new isolate of *Bacillus thuringiensis* subsp. *tolworthi*. **Nucleic Acids. Research**. v.18, p.1305, 1990.

SMITH, R. A.; COUCHE, G. A. The philloplane as a source of *Bacillus thuringiensis* variants. **Applied Environmental Microbiology**, v.57, p.311-331, 1991.

STEINHAUS, E.A. Insect pathology: Challenge, achievement and promise. Bull. **Entomology Soc. Am.** v.6, p.9-16, 1960.

SOUTHERN E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **Journal Molecular Biology**. v.98, p.503-517, 1975.

TAYLOR R., TIPPET, J.; GIBB, G.; PELLIS, S.; PIKE, D.; JORDAN, L.; ELY, S. Identification and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin entomocidal to coleopteran and lepidopteran larvae. **Molecular Microbiology**. v.6, p.1211-1217, 1992.

THOMAS D. J. I., MORGAN, J. A. W.; WHIPPS, J. M. and SAUNDERS, J. R. Plasmid Transfer Between the *Bacillus thuringiensis* Subspecies *kurstaki* and *tenebrionis* in Laboratory Culture and Soil and in Lepidopteran and Coleopteran Larvae. **Applied Environmental Microbiology**. v.66, p.118-124, 2000.

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

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

VAURIE, P. The Gregorio Bohdar types of South American weevils (Coleoptera, Curculionidae). **American Museum Novitates**, 1615: 1-39, 1978.

8. Apêndice 1: Alinhamento das seqüências de aminoácidos das linhagens *B. thuringiensis* var. *tenebrionis*, *B. thuringiensis* var. *tolworthi*, *B. thuringiensis* var. *kurstaki* – HD1 e *B. thuringiensis* var. *londrina*.

```

tenebrionis      -----MNPNNRSEHDTIKTTENNEVPTNHVQYPLAETPNPTLEDLNYKEFLRMTADN
52
tolworthi      MIRMGGRKMNPNNRSEYDTIKVTPNSELPTNHNQYPLADNPNSTLEELNYKEFLRMTADN
60
kurstaki       -----MDNPNINCECIPYNCLSNP-----EVEVLGGERIETGY
33
londrina       -----

tenebrionis    NTEALDSSTTKDVIQKGISVVGDLLGVVGFPPGGALVSFYTNFLNTIWPSE-DPWKAFME
111
tolworthi     STEVLDSSTVKDAVGTGISVVGQILGVVGVFPFAGALTSFYQSFLNAIWPSDADPWKAFMA
120
kurstaki      TPIDISLSLTQFLLSEFVPGAGFVLGLVDIIWG-----IFGPSQ---WDAFPV
78
londrina      -----VNEMKV
6

. :

tenebrionis    QVEALMDQKIADYAKNKALAELOGLQNNVEDYVSALSSWQKNPVSSRNPHSQGRIRELFS
171
tolworthi     QVEVLIDKKIEEYAKSKALAELOGLQNNFEDYVNALDSWKKAPVNLRSRRSQDRIRELFS
180
kurstaki      QIEQLINQRIEEFARNQAI SRLEGLSNLYQIYAESFREWEADPTN---PALREEMRIQFN
135
londrina      VVGSKNKTKVGAVEKVKWDAEITSLVSPXGVSAQPFSDEE-----TMQGAIN
53

: . :: : :. *. . . . : : :

tenebrionis    QAESHFRNSMPSFAISGYEVLFLTTYQAANTHLFLLKDAQIYGEEWGYEKEDIAEFYKR
231
tolworthi     QAESHFRNSMPSFAVSKFEVLFLPTYQAANTHLLLLKDAQVFGEEWGYSSEDIAEFYQR
240
kurstaki      DMNSALTTAIPLLAVQNYQVPLLSVYVQAANLHLSVLRDVSFVFGQRWGFDAATINSRYND
195
londrina      RAKRALENEMKVVVGS-----KNKTKVG-----
76

: : . : . . . : : *

tenebrionis    QLKLTQEYTDHCVKWNVGLDKLRGSSYESWVNFNRYRREMTLTVLDLIALFPLYDVRLY
291
tolworthi     QLKLTQQYTDHCVNWNVGLNSLRGSTYDAVVKFNRFREMTLTVLDLIVLFPFYDVRLY
300
kurstaki      LTRLIGNYTDYAVRWYNTGLERVWGPDSRDWVRYNQFRRELTTLVLDIVALFSNYDSRRY
255
londrina      -----AVEKVV-----KDAEITSLVSPGVSAQPFS-----
101

. : : : : : : : : * * . : : .

tenebrionis    PKEVKTELTRDVLTDPIVGVNNLRGYGTTFSNINIENYIRKPHLFDYLHRIQFHTRFQPGYY
351

```

tolworthi SKGVKTELTRDIFTDPIFTLNALQEYGPTEFSSSIENSIRKPHLFDYLRGIEFHTRLRPGYS
360
kurstaki PIRTVSQLTREIYTNPVLEN-FDGSFRGMAQRIEQNIRQPHLMDILNSITIYTDVHRG--
312
londrina -----EETMQGAINRAKRALEE-----
118

.

tenebrionis GNDSFNYWSGNYVSTRPSIGSNDIITSPFYGNK-SSEPQVQNFNGEKVYRAVANTNLAV
410
tolworthi GKDSFNYWSGNYVETRPSIGSNDTITSPFYGDK-SIEPIQKLSFDGQKVYRTIANTDIAA
419
kurstaki ----FNYWSGHQITASPVGFSGPEFAFPLFGNAGNAAPPVLVSLTGLGIFRTLSSPLYRR
368
londrina -----GEAPIGIGLEG-GVMKTEHGLFMCN
142

. : : * : : : .

tenebrionis WP-SAVYSGVTKVEFSQYNDQTDDEASTQTYDSKRNVGAV-SWDSIDQLPPETTDEPLEKG
468
tolworthi FPDGKIYFGVTKVDFSQYDDQKNETSTQTYDSKRYNGYLGAQDSIDQLPPETTDEPLEKA
479
kurstaki IILGSGPN--NQELFVLDGTEFSFASLTTLNLPSTIYRQRTVDSL DVIPPQDNSVPPRAG
426
londrina WG-----ALXTSDGKXFVAGXXRITLPXX-----FLXPLEXGXELEGA
180

. . . : * . . .

tenebrionis YSHQLNYVMCFLMQG---SRGTIPVLTWTHKSVDFNFMIDSKKITQLPLVKAYKLQSGAS
525
tolworthi YSHQLNYAECFLMQD---RRGTIPFFTWTTHRSVDFNTIDAEEKITQLPVVKAYALSSGAS
536
kurstaki FSHRLSHVTMLSQAAGAVYTLRAPTFSWQHRSAEFNNIIPSSQITQIPLTKSTNLGSGTS
486
londrina IGIGLEGGVMKTEHG-----LFMCNWGALTS DGK FVAGRITLPFLPLEGELXXXMXXX
233

. * . . * : : : . : * :

tenebrionis VVAGPRFTGGDIIQCTENG-SAATIIYVTP-DVSYSQKYRARIHYASTSQITFTLSLDGAP
583
tolworthi IIEGPGFTGGNLLFLKESSNSIAKFKVTLNSAALLQRYRVRIRYASTTNLRLFVQNSNND
596
kurstaki VVKGPGFTGGDILRRTSPG--QISTLRVNITAPLSQRYRVRIRYASTTNLQFHTSIDGRP
544
londrina XX-----XXDIMDI-----
242

: : :

tenebrionis FNQYYFDKTINKGDTLTYN SFNLASFSTPFELSG--NNLQIGVTGLSAGDKVYIDKIEFI
641
tolworthi FLVIYINKTMNIDGDLTYQTFDFATSNSNMGFSGDTNDFIIGAESFVSNEKIYIDKIEFI
656

kurstaki INQGNFSATMSSGSNLQSGSFRTVGFTTPFNFSNGSSVFTLSAHVFNSGNEVYIDRIEFV
 604
londrina -----

tenebrionis PVN-----
 644
tolworthi PVQ-----
 659
kurstaki PAEVTFEAEYDLERAQKAVNELFTSSNQIGLKTDTVTDYHIDQVSNLVECLSDEFCLDEKQ
 664
londrina -----

tenebrionis -----
tolworthi -----
kurstaki ELSEKVKHAKRLSDERNLLQDPNFRGINRQLDRGWGSTDITIQGGDDVFKENYVTLTLLGT
 724
londrina -----

tenebrionis -----
tolworthi -----
kurstaki FDECYPTYLYQKIDESKCLKAYTRYQLRGYIEDSQDLEIYLRYNKHE TVNVPGTGSLWP
 784
londrina -----

tenebrionis -----
tolworthi -----
kurstaki LSAQSPIGKCGEPNRCAPHLEWNPDLDCSCRDGEKCAHSHHFSLDIDVGCTDLNEDLGV
 844
londrina -----

tenebrionis -----
tolworthi -----
kurstaki WVIFKIKTQDGHARLGNLEFLEEKPLVGEALARVKRAEKKWRDKREKLEWETNIVYKEAK
 904
londrina -----

tenebrionis -----
tolworthi -----
kurstaki ESVDALFVNSQYDQLQADTNIAMIIHAADKRVHSIREAYLPELSVIPGVNAAIFEELEGRI
 964
londrina -----

tenebrionis -----
tolworthi -----
kurstaki FTAFSLYDARNVIKNGDFNNGLSCWNVKGHVDVEEQNNQRSVLLVPEWEAEVVSQEVVPCP
 1024
londrina -----

tenebrionis -----

tolworthi -----
kurstaki GRGYILRV TAYKEGYGEGCVTIHEIENNTDELKFSNCV EEEIYPNNTVTCNDYTVNQEEY
 1084
londrina -----

tenebrionis -----
tolworthi -----
kurstaki GGAYTSRNRGYNEAPSV PADYASVYEEKSYTDGRRENPC EFNRGYRDTPLPVGYVTKEL
 1144
londrina -----

tenebrionis -----
tolworthi -----
kurstaki EYFPETDKVWIEIGETEGTFIVDSVELLLMEE 1176
londrina -----

9. Anexo 1: Ingredientes e medidas utilizados para o preparo da dieta artificial para o inseto *S. levis*.

Ingredientes	Quantidades
Caseína	125 g
Sais de Wesson	35g
Açúcar	76 g
Germe de trigo	108 g
Bagaço de cana-de-açúcar	30 g
Acido Ascórbico	15 g
Wintonylom	2,5 ml
Caragenato	90 g
Solução Vitamínica	35 ml
Solução de KOH	18 ml
Solução B	53 ml
Solução B	Nipagim – 70 g Acido Sórbico – 70 g Álcool 70% - 500 ml
Solução KOH	KOH - 11,25 g Água destilada - 200 ml