



**THAÍS BARROS RODRIGUES**

**PROSPECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE  
ISOLADOS DE *Bacillus thuringiensis* NO  
CONTROLE DE *Spodoptera frugiperda***

**LAVRAS - MG  
2011**

**THAÍS BARROS RODRIGUES**

**PROSPECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Bacillus thuringiensis* NO CONTROLE DE *Spodoptera frugiperda***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós- Graduação em Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Edílson Paiva  
Coorientador: Fernando Hercus Valicente

**LAVRAS – MG  
2011**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca da UFLA**

Rodrigues, Thaís Barros.

Prospecção e caracterização de isolados de *Bacillus thuringiensis* no controle de *Spodoptera frugiperda* / Thaís Barros Rodrigues. – Lavras : UFLA, 2011.

118 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.

Orientador: Edílson Paiva.

Bibliografia.

1. Bactéria entomopatogênica. 2. Rep-PCR. 3. Bioensaio. 4. Lagarta-do-cartucho. 5. Genes Bt. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

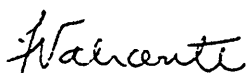
CDD – 632.96

**THAÍS BARROS RODRIGUES**

**PROSPECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Bacillus thuringiensis* NO CONTROLE DE *Spodoptera frugiperda***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós- Graduação em Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 29 de agosto de 2011.



Dr. Fernando Hercos Valicente

EMBRAPA



Dr. Manoel Victor Franco Lemos

UNESP



Dr. Edilson Paiva

Orientador

**LAVRAS – MG  
2011**

*Aos meus pais, Sandra e José, por sempre me incentivarem nos estudos, me apoiando e vibrando com cada etapa cumprida.*

*Ao meu irmão, Thiago, pelos imensos gestos de carinho e amizade.*

*À minha avó, Célia, por sempre estar ao meu lado, sorrindo e chorando comigo.*

*Ao meu tio Tadeu, pela torcida e exemplo de inteligência.*

## **DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre caminhar ao meu lado.

À Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, pela oportunidade.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de estudo.

À Embrapa Milho e Sorgo pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

Ao Dr. Edilson Paiva, pela confiança, oportunidade e disponibilidade sempre que necessária.

Ao Dr. Fernando Hercos Valicente, por todo o carinho, apoio, valiosos ensinamentos e esforços não medidos para me orientar não só durante o mestrado, mas pelo longo caminho que me resta.

Ao Dr. Newton Portilho Carneiro por aceitar o convite para membro da banca de qualificação, contribuindo grandemente com o trabalho.

Ao Dr. Manoel Victor, pela prontidão em participar da banca da defesa.

Ao Dr. Emerson Cristi de Barros pelas análises estatísticas.

Ao Dr. Roberto Willians Noda pelas análises de bioinformática.

Ao Ubiraci Gomes de Paula Lana pelas informações e ajuda prestada.

Ao Dr. Mário César Laboissière Del Sarto e à Dra. Katia Gisele Brasil Boregas por aceitarem o convite para membros suplente na banca de defesa.

Aos amigos do Laboratório de Controle Biológico, da Embrapa Milho e Sorgo, Celso, Osmar, Arthur, Camila, Carine, Débora e Rodrigo pelas ajudas experimentais e excelente convívio, tornando os dias de trabalho prazerosos e alegres.

Ao André, pela ajuda direta no projeto.

À minha amiga e grande parceira Rosane, pela ajuda durante todo o experimento e escrita do trabalho.

Ao meu namorado, Gabriel, por toda ajuda durante todo o experimento e escrita do trabalho, pela dedicação, carinho e paciência.

Às minhas irmãs de república Bárbara, Larissa, Mariah e Marina pelo carinho, cuidado, companheirismo e relação sincera de amizade.

Às minhas melhores amigas Aline, Isabela, Lais, Lussane, Nathália e Thaís por estarem sempre presentes na minha vida, independente da distância.

Aos amigos do curso de mestrado em Biotecnologia Vegetal, especialmente Thaís, Jairo, João, Fabrício e Samuel pelas noites viradas estudando e pelos momentos de descontração.

Aos colegas, funcionários, professores e pesquisadores da Universidade Federal de Lavras e Embrapa Milho e Sorgo.

Aos meus queridos pais Sandra e José, pela luta diária em proporcionar a mim e ao meu irmão o melhor.

Ao meu irmão amado, Thiago, por fazer parte da minha vida.

Aos meus avós, tias, tios, primos, primas, Carina e Dimas pela torcida e apoio.

*“A longo prazo os homens acertam apenas para aquilo que apontam. Por isso, embora falhem imediatamente, seria melhor que apontassem para algo mais alto.”*

Henry Thoreau



## RESUMO

*Bacillus thuringiensis* (Bt) é uma bactéria de ocorrência ubíqua encontrada em substratos como solo, água, superfície de plantas, insetos mortos, etc, caracterizada pela produção de proteínas tóxicas a insetos (Cry, Cyt e Vip). Bt é considerada a principal bactéria entomopatológica com ampla utilização no controle biológico de pragas, como inseticidas e em plantas transgênicas resistentes a pragas. O objetivo desse trabalho foi a prospecção de cepas de Bt em diferentes áreas, a caracterização gênica, a diversidade genética existente entre elas e sua toxicidade para *Spodoptera frugiperda*, uma das pragas mais importante do milho. As amostras foram coletadas na área experimental da Embrapa Milho e Sorgo (solo e palhada da mata de pinheiros; solo de cerrado; solo de lavoura/pecuária; solo da margem da lagoa; solo de área com utilização de pivô central; solo de várzea; solo de usina de álcool desativada). Após o isolamento, reações de PCR foram realizadas utilizando *primers* (originais e descritos na literatura) para a caracterização dos genes *cry*, *cyt* e *vip*. O estudo da divergência genética entre as cepas utilizou o método de rep-PCR, com os *primers* BOX-PCR, ERIC1/ERIC2-PCR e REP1/REP2-PCR. O teste de toxicidade foi feito em bioensaio utilizando suspensões de Bt, controle positivo (Bt344 *B. tolworthi*) e testemunha. As lagartas usadas estavam no segundo instar e a avaliação foi feita após 1 semana. Das 178 colônias obtidas, cristais foram detectados em 35% das colônias, sendo a palhada da mata de pinheiro a maior incidência com 68%, seguido da área do pivô (21%), área da lagoa, várzea e usina de álcool desativada (3%) e solo da área de pinheiro (2%), nenhuma cepa foi encontrada nas regiões do cerrado e lavoura/pecuária. Nas amostras, observou-se quanto ao formato, que 64,5% dos cristais são esféricos, 29% esférico e cubóide e 6,5% em formato bipiramidal. Os genes mais abundantes nesta amostragem foram *cry1Ab*, *vip3Aa* e *cry9*, com 63%, 56% e 43%, respectivamente. Os genes *cyt* tiveram sua maior frequência com *cyt1Aa/cyt1Ab/cyt1Ba*, presente em 5% das cepas. Quanto à diversidade genética, quatro grupos foram distintamente definidos e os dados sugerem uma relação entre a similaridade de cepas de *B. thuringiensis* e seus locais de origem. As cepas analisadas não apresentaram taxas significativas de mortalidade para *S. frugiperda* (máxima de 20%), observou-se uma tendência ao agrupamento de cepas com mesmo padrão de mortalidade. Já com relação à constituição gênica não foi observada relação direta com a diversidade das cepas, mas indireta pela formação do cristal, apresentando essa forte relação com os grupos de similaridade formados.

Palavras-chave: Bactéria entomopatogênica; rep-PCR; bioensaio; lagarta-do-cartucho; genes Bt

## ABSTRACT

*Bacillus thuringiensis* (Bt) is an ubiquitous bacterium and it may be found in substrates such as soil, water, plant surfaces, dead insects, etc, being characterized by the production of toxic proteins to insects (Cry, Cyt and Vip). Bt is considered the main entomopathogenic bacterium, widely used in biological control of pests, as bioinsecticides and in transgenic plants resistant to insect pests. The aim of this work was the prospection of Bt strains in diverse habitats, their genetic characterization, genetic diversity and their toxicity for *Spodoptera frugiperda*. The samples were collected in different areas (forest pine soil and straw; cerrado soil, crop/livestock soil, lake area soil; central pivot soil; lowland soil and soil from ethanol distillery) of Embrapa Maize and Sorghum Research Station, located in Sete Lagoas, MG. After Bt isolation, PCR reactions were performed using primers for the characterization of *cry*, *cyt* and *vip* genes. For the study of the genetic diversity rep-PCR analysis BOX-PCR, ERIC1/ERIC2-PCR e REP1/REP2-PCR primers were used, with. The toxicity test was performed using Bt suspensions and, a positive control (Bt344 *B. thuringiensis*). Second instar larvae were used and mortality was recorded after a week. From 178 bacterial colonies obtained, crystals were detected in 35% of the isolates, and 68% were from pine forest straw, followed by central pivot (21%), lowland and ethanol distillery soil (3%) and forest pine soil (2%). No Bt strain was detected in cerrado and crop/livestock soil. Bt crystals were observed as: 64% with spherical shape, 29% of spherical and cuboid shape, and 6,5% with bipyramidal shape. The most frequent genes were *cry1Ab*(63%), *vip3Aa* (56%) and *cry9* (43%), The *cyt* gene showed the most common profile with *cyt1Aa/cyt1Ab/cyt1Ba*, being found in 5% of the strains. Genetic diversity analysis showed four groups that were clearly defined, and the data infer in a relationship between the groups formed and the places of origin. The strains did not show significant mortality rates to *S. frugiperda* (at most 20%), it was observed that strains with similar toxicity were grouped together. The genetic composition was not directly related to the diversity of strains, but indirectly related to the formation of the crystal, and showed a strong relationship with strains of within groups.

Keywords: Entomopathogenic bacterium; rep-PCR; bioassay; fall armyworm; Bt genes

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	18
2 REFERENCIAL TEÓRICO .....	20
2.1 A CULTURA DO MILHO .....	20
2.2 LAGARTA DO CARTUCHO DO MILHO ( <i>Spodoptera frugiperda</i> ).....	22
2.3 <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	25
2.3.1 PROTEÍNAS CRY .....	31
2.3.2 PROTEÍNAS CYT .....	35
2.3.3 PROTEÍNAS VIP .....	38
2.3.4 APLICAÇÕES AGRONÔMICAS DO BT: BIOINSETICIDAS E CULTURAS BT .....	40
2.4 TÉCNICAS MOLECULARES APLICADAS À PROSPECÇÃO, CARACTERIZAÇÃO, ESTUDO DA DIVERSIDADE GÊNICA E IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA .....	48
2.4.1 rep-PCR .....	48
2.4.2 MULTIPLEX PCR .....	50
3.1 COLETA DAS AMOSTRAS E ISOLAMENTO DAS CEPAS DE BT .....	51
3.2 DIVERSIDADE GENÉTICA AVALIADA POR rep-PCR.....	56
3.2.1 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO DNA .....	56
3.2.2 PCR COM OS <i>PRIMERS</i> REP, ERIC E BOX .....	57
3.2.3 ANÁLISE DA DISSIMILARIDADE .....	58

3.3 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR .....	59
3.3.1 DESENHO E VALIDAÇÃO DOS <i>PRIMERS</i> .....	59
3.3.2 AMPLIFICAÇÃO DO DNA .....	61
3.4 BIOENSAIO DE MORTALIDADE PARA <i>Spodoptera frugiperda</i> .....	65
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	67
4.1 COLETA DAS AMOSTRAS E ISOLAMENTO DAS CEPAS DE BT .....	67
4.2 DIVERSIDADE GENÉTICA AVALIADA POR rep-PCR.....	71
4.2.2 PCR COM OS <i>PRIMERS</i> REP, ERIC E BOX .....	71
4.2.3 ANÁLISE DA DISSIMILARIDADE .....	74
4.3 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR .....	79
4.3.1 VALIDAÇÃO DOS <i>PRIMERS</i> .....	79
4.3.2 AMPLIFICAÇÃO DO DNA .....	84
4.4 BIOENSAIO DE MORTALIDADE PARA <i>Spodoptera frugiperda</i> .....	91
5 CONCLUSÕES .....	97
6 REFERÊNCIAS.....	98

## 1 INTRODUÇÃO

O milho é uma gramínea pertencente à família Poaceae, tribo Maydeae, gênero *Zea* e espécie *Zea mays* L. Esse cereal é o terceiro mais cultivado no mundo, perdendo apenas para o trigo e o arroz. O Brasil é o terceiro maior produtor do grão, atrás apenas dos Estados Unidos e China, respectivamente. A maior parte desses grãos, cerca de 70%, é destinada à cadeia produtiva de suínos e aves, sendo o restante destinado ao consumo humano e, mais recentemente, à produção de energia (CONAB, 2011). Um dos maiores problemas da agricultura mundial é o ataque de uma ampla gama de pragas e no milho a redução de rendimento varia em níveis de 17,7% a 55,6% (CRUZ, 2008).

Também conhecida como lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda* é a principal praga da cultura do milho (BUSATO et al., 2004). Trata-se de um inseto pertencente à ordem Lepidoptera, conhecida na fase adulta como mariposas ou borboletas. No controle biológico de pragas atuam patógenos, parasitóides e predadores. Nesse tipo de controle atuam inseticidas formulados com bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* (Bt) (VALICENTE; ZANASI, 2005; FATORETTO et al., 2007; AGROFIT, 2003). O uso de híbridos ou variedades transgênicas de milho, que são conhecidas por milho Bt, nas quais foram inseridos genes da bactéria *B. thuringiensis* Berliner, são alternativas para o manejo da lagarta do cartucho e outras larvas de lepidópteras que incidem na cultura do milho (CHIARADIA, 2010).

*B. thuringiensis* é uma bactéria Gram-positiva, aeróbica ou facultativamente anaeróbica (RASKO et al., 2005), em forma de bastonete, formadora de esporos e que tem a capacidade de produzir, durante a esporulação, diversas inclusões cristalinas altamente específicas, que são responsáveis pela atividade tóxica desta bactéria (GLARE; O'CALLAGHAM,

2000; HABIB; ANDRADE, 1998). Esporos de *B. thuringiensis* podem ser isolados de diversos ambientes como solo, rizosfera, filoplano, água fresca, poeiras de grãos e de insetos, crustáceos, anelídeos e mamíferos insetívoros. (RAYMOND et al., 2010). Além das endotoxinas Cry e Cyt, outra classe de proteínas que podem contribuir para a virulência de *B. thuringiensis* em insetos-praga específicos são as proteínas vegetativas, denominadas Vip, que possuem, assim como as proteínas formadoras de cristais, elevada toxicidade para lepidópteros como *S. frugiperda* e *Helicoverpa zea* (GLARE; O'CALLAGHAM, 2000).

Bt é o principal agente de controle biológico utilizado atualmente, sendo responsável por aproximadamente 2% do mercado mundial de inseticidas (LAMBERT et al., 1992; SCHNEPF et al., 1998). Esse agente é o responsável por mais de 90% do total das vendas de biopesticidas (GLARE; O'CALLAGHAM, 2000), tendo sido usada no campo durante os últimos 50 anos (ALI et al., 2010). É também a bactéria fornecedora do gene que confere resistência a todos os transgênicos resistentes à pragas no mundo. Além da aceitação do público, outra barreira a ser vencida, nessa nova era dos transgênicos, é a durabilidade da tecnologia e para esse fator, além da piramidação e rotação de genes, outra alternativa seria a descoberta de novos genes para confecção de transgênicos com novos genes.

Este trabalho teve por objetivo a caracterização de cepas de *B. thuringiensis*, coletadas em diferentes áreas, quanto a presença de genes *cry*, *cyt* e *vip*, a verificação da diversidade genética entre as cepas e a toxicidade dessas para o inseto praga *Spodoptera frugiperda*.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 A cultura do milho

O milho é uma gramínea pertencente à família Poaceae, tribo Maydeae, gênero *Zea* e espécie *Zea mays* L. Possui ampla variabilidade genética, sendo atualmente cerca de 300 raças e, dentro de cada raça, inúmeras variedades. Essa grande variabilidade se traduz também quanto às adaptações climáticas, de altitude e latitude, em características agronômicas desejáveis, no tamanho e composição química de grãos, tipo de endosperma e qualidade das proteínas (PATERNIANI; NASS; SANTOS, 2000).

Esse cereal é o terceiro mais cultivado no mundo, perdendo apenas para o trigo e o arroz. O Brasil é o terceiro maior produtor do grão, atrás apenas dos Estados Unidos e China, respectivamente. A maior parte desses grãos, cerca de 70%, é destinada à cadeia produtiva de suínos e aves, sendo o restante destinado ao consumo humano e, mais recentemente, à produção de energia (CONAB, 2011).

De acordo com o último levantamento de acompanhamento da safra brasileira de grãos 2010/2011 publicado em maio de 2011, pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), a área total cultivada com milho no Brasil deve alcançar 13.474,9 mil hectares, representando um crescimento de 3,7% em relação à safra 2009/2010, sendo boa parte desse aumento reflexo da recuperação da área semeada da região Nordeste. Essa área total é resultante da soma das duas safras do milho: Primeira Safra, ou safra de verão, e Segunda Safra, ou Safrinha.

A participação da Primeira Safra deverá ser de aproximadamente 58%, estando estimada em 7.767,7 mil hectares, uma variação percentual 0,6% maior do que a área cultivada na Primeira Safra 2009/2010, que foi de 7724,0 mil

hectares. O restante da participação da área total cultivada será da Segunda Safra, com aproximadamente 42%, estando previsto o cultivo de 5707,2 mil hectares, 8,3% maior do que a área semeada na safra anterior que foi de 5269,9 mil hectares. Este tipo de lavoura se localiza basicamente na região Centro-Oeste, onde é semeada logo após a colheita da soja.

A produtividade média prevista para a Primeira Safra é de 4.427kg/ha, 0,3% maior que a safra anterior. Para o milho Safrinha a produtividade esperada é de 3.789kg/ha, podendo oscilar para mais ou menos dependendo dos efeitos climáticos. A média da produtividade nacional este ano deve ficar em 4.156kg/há, 3,6% menos que a safra anterior, que alcançou 4.311kg/ha.

A produção brasileira do milho esperada para a safra 2010/2011 é de 56,0 milhões de toneladas, sendo 34,38 milhões de toneladas (61%) da Primeira Safra, e 21,62 milhões de toneladas (39%) da Segunda Safra. O produto gerado, no geral, é de boa qualidade devido ao pacote tecnológico utilizado pelos produtores, sementes de qualidade, clima favorável, maquinário adequado e assistência técnica aos produtores.

Entre os pequenos agricultores, o sistema de plantio ainda predominante é o Plantio Convencional, embora seja crescente a adoção do Plantio Direto. O Plantio Direto é o sistema mais usado principalmente nas grandes áreas, e o Plantio Convencional é usado na abertura de novas áreas e nas áreas em que estavam estabelecidas anteriormente pastagens.

Um dos maiores problemas da agricultura mundial é o ataque de uma ampla gama de pragas. No milho, esse ataque pode ocorrer na raiz, folha, espiga e pendões. Quando a incidência se dá na parte aérea da planta a aplicação das medidas de controle à praga é mais fácil pois a visibilidade do ataque é maior que quando se dá na parte subterrânea. Esse ataque na raiz, por exemplo, é muitas vezes confundido com deficiência nutricional, efeitos das adversidades climáticas ou má qualidade da semente plantada (ÁVILA; PARRA, 2004;



MORÓN, 2004). A redução de rendimento na cultura do milho devido ao ataque de pragas varia em níveis de 17,7% a 55,6% (CRUZ, 2008).

## **2.2 Lagarta do cartucho do milho (*Spodoptera frugiperda*)**

A lagarta do cartucho (*Spodoptera frugiperda*) é um inseto pertencente à ordem Lepidoptera, que possui metamorfose completa (holometabolía), passando pelas fases de ovo, larva (lagarta), pupa (crisálida) e adulta. Apesar dos adultos não causarem nenhum dano, sua forma larval (de hábito fitófago) é prejudicial, atacando a cultura e causando diversos prejuízos. As larvas são do tipo cruciforme, destacando-se do resto do corpo, com aparelho bucal mastigador. São constituídas de 10 segmentos abdominais, apresentando no tórax 3 pares de pernas e geralmente possuem falsas pernas abdominais dotadas de “ganchos” (GALLO et al., 2002; COSTA; IDE; SIMONKA, 2006).

A coloração da lagarta do cartucho varia de pardo-escuro à esverdeada, podendo ter coloração quase preta. Possui um destacado “Y” invertido na parte anterior da cabeça, formado pelas suturas frontais, e tem quatro manchas escuras no dorso do último segmento abdominal (ZUCCHI; SILVEIRA NETO; NAKANO, 1993).

Essa lagarta passa por cinco ou seis estágios larvais, atingindo 40 a 50 mm de comprimento e 2,7 a 2,78 mm de largura da cápsula cefálica. As lagartas recém-eclodidas são esbranquiçadas, possuem cabeça mais larga do que o corpo e apresentam mais pêlos que as mais velhas. No primeiro instar, as lagartas medem 1,9 mm de comprimento, com cápsula cefálica medindo 0,3 mm de largura. Já as larvas de último instar têm o corpo cilíndrico, de coloração marrom-acinzentada no dorso, esverdeada na parte ventral e subventral, que também apresenta manchas de coloração marrom-avermelhada. A duração da fase larval é de 12 a 30 dias (CRUZ, 1995).

Findo o período larval, as lagartas penetram no solo, onde se transformam em pupas. Inicialmente a pupa é de coloração verde-clara com o tegumento transparente. Nesta fase o corpo é frágil e sensível a injúrias, depois de algum tempo a pupa torna-se alaranjada e mais tarde passa à coloração marrom-avermelhada. Próximo à emergência a pupa torna-se escura, quase preta (CRUZ, 1995). Sua fase pupal tem duração de 10 a 12 dias, tendo colocação avermelhada e de 9 a 15 mm de comprimento (ZUCCHI; SILVEIRA NETO; NAKANO, 1993).

Na sua fase adulta, ou seja, as mariposas medem de 30 a 40 mm de envergadura, possuem asas anteriores de coloração parda, uniformes nas fêmeas e com manchas claras nos machos, tendo as asas posteriores coloração branco-acinzentada (ZUCCHI; SILVEIRA NETO; NAKANO, 1993). Essa fase adulta do inseto atinge aproximadamente 15 dias (SANTOS et al., 2004) botando as fêmeas até 2 mil ovos de formato esférico que são depositados em grupos sobre as folhas das plantas (CRUZ, 2008).

Logo após a oviposição, o ovo é de coloração verde-clara, passando para uma coloração alaranjada após 12 ou 15 horas. Próximo à eclosão das lagartas (aproximadamente 3 dias, no verão), o aspecto se torna escurecido, devido à cabeça negra da lagarta, vista através do córion. A massa de ovos é coberta por uma camada fina de escamas, colocada pela fêmea por ocasião da postura (CIA; FREIRE; SANTOS, 1999).

O ciclo biológico desse inseto em plantas de milho completa-se em 25 dias à temperatura de 25°C, aumentando o número de dias quando as temperaturas estão mais baixas (BUSATO; GRUTZMACHER; GARCIA, 2005a,b).

Também conhecida como lagarta militar, *S. frugiperda* é a principal praga da cultura do milho, atacando em menor intensidade as culturas de arroz, sorgo e capim-arroz (BUSATO et al., 2004). Além dessas culturas, Leiderman e

Sauer (1953) relatam que a praga pode atacar alfafa, algodão, amendoim, aveia, batata, batata-doce, cana de açúcar, hortaliças e trigo, sendo mais encontrada em gramíneas. Outras lagartas, consideradas pragas secundárias do milho são: lagarta da espiga (*Helicoverpa zea*), broca da cana (*Diatraea saccharalis*), broca do colo (*Elasmopalpus lignosellus*), lagarta rosca (*Agrotis ipsilon*), entre outras (CHIARADIA, 2010).

Seu ataque se dá desde emergência à fase de enchimento dos grãos da espiga (ÁVILA; DEGRANDE; GOMEZ, 1997; CRUZ, 2007). A praga possui ampla distribuição geográfica nas Américas (KING; SAUNDERS, 1984; ZUCCHI; SILVEIRA NETO; NAKANO, 1993) e infesta as plantações de milho nas suas duas safras: safra de verão e safrinha (GALLO et al., 2002).

*S. frugiperda* prefere infestar o cartucho das plantas, onde as lagartas pequenas raspam as folhas sem consumir a epiderme membranosa da face inferior, tendo o sintoma de “folhas raspadas”. A partir do seu segundo instar, as lagartas consomem as folhas do cartucho, permanecendo até completar seu desenvolvimento larval, ou seja, a praga compromete tanto as plantas pequenas quanto as maiores (CRUZ, 2008).

Apesar da sua preferência de ataque, a lagarta pode atacar as plântulas de milho rente ao solo, causando danos semelhantes aos da lagarta-rosca (CHIARADIA, 2007). Podem também atacar o colmo do milho, bloquear o pedúnculo da espiga impedindo a formação dos grãos e penetrar na base ou ponta da espiga para alimentar-se de grãos leitosos, facilitando a infecção por microorganismos (GALLO et al., 2002; CRUZ; VIANA; WAQUIL, 2002; CRUZ, 2007).

No ataque dessa praga, o que se observa é apenas uma lagarta por planta de milho ou às vezes várias espécimes ocorrendo em uma mesma plantas, mas separados pelas folhas. Esse ataque individual é acentuado pelo hábito canibal da lagarta do cartucho (GALLO et al., 2002).

No controle biológico da lagarta do cartucho atuam patógenos, parasitóides e pradadores. Dentro desse tipo de controle atuam inseticidas formulados com bactéria entomopatogênica *B. thuringiensis* (Bt) (VALICENTE; ZANASI, 2005; FATORETTO et al., 2007; AGROFIT, 2003); com vírus conhecido como Baculovirus spodoptera (GERK; KITAJIMA; SOUZA, 1997; GOMEZ; MOSCARDI; SOSAGOMEZ, 1999; MATRANGOLO; MARTINS-DIAS; CRUZ, 2007); e com fungo *Baeuveria bassiana* (Bals) (CARNEIRO et al., 2004). No entanto, Cruz (2008) observou que muitas vezes o controle dessa praga em lavouras de milho por pulverização se verificou ineficiente pela dificuldade do inseticida em atingir as lagartas ou pelo fato das plantas não reterem a dose necessária de ingredientes inseticidas ativos para matar o inseto.

Como alternativas para manejar a lagarta do cartucho e outras larvas de lepidópteros que incidem na cultura do milho há o uso de híbridos ou variedades transgênicas de milho, que são conhecidas por milho Bt, nas quais foram inseridos genes da bactéria *B.thuringiensis* Berliner (CHIARADIA, 2010).

### 2.3 *Bacillus thuringiensis*

A história da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bacillaceae) começou em 1901 quando uma epidemia causou a mortalidade em massa de larvas do bicho-da-seda (*Bombyx mori*) no Japão, ficando conhecida como “sotto-disease”. O bacteriologista japonês Ishiwata, estudando essa epidemia conseguiu isolar uma bactéria, até então desconhecido, da larva morta. Já nessa época o pesquisador relatou a existência de uma toxina que estaria relacionada com a morte das larvas (ISHIWATA 1901, 1905, 1906).

Em 1908, Iwabuchi denominou a bactéria descoberta como *B. sotto* Ishiwata, mas posteriormente essa nomenclatura foi considerada inválida (GLARE; O’CALLAGHAM, 2000). Em 1911 Berliner isolou células de uma

bactéria formadora de esporos, de lagartas da espécie *Anagasta kuehniella* (mariposa da farinha) e em 1915, em homenagem à província alemã de Thuringia, de onde foi isolada, a denominação *Bacillus thuringiensis* foi adotada. 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.

A denominação *Bacillus thuringiensis* geralmente é empregado para uma única espécie, mas considerando aspectos taxonômicos esta bactéria pertence a um complexo de várias espécies denominado *B. cereus* (*B. anthracis*, *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. thuringiensis* e *B. weihenstephanensis*). As espécies *B. thuringiensis* e *B. cereus* mostram características fenotípicas e bioquímicas comuns, mas por definição, *B. thuringiensis* pode ser diferenciado pela presença dos cristais (LUTHY; WOLFERSBERGER, 2000), visíveis em microscopia de contraste de fase. Esta semelhança é devido tanto à capacidade do Bt de parar de produzir as  $\delta$ -endotoxinas, “tornando-se” *B. cereus*, quanto a transferência de plasmídeos, que codificam essas toxinas, de Bt para *B. cereus*. A distinção entre estas espécies não é clara e continua sendo assunto de interesse de muitos taxonomistas (GLARE; O’CALLAGHAM, 2000; HANSEN; SALAMITOU, 2000; SCHNEPF et al., 1998).

*B. thuringiensis* é uma bactéria Gram-positiva, aeróbica ou facultativamente anaeróbica (RASKO et al., 2005), em forma de bastonete, formadora de esporos e que tem a capacidade de produzir, durante a esporulação, diversas inclusões cristalinas altamente específicas, que são responsáveis pela atividade tóxica desta espécie (GLARE; O’CALLAGHAM, 2000; HABIB; ANDRADE, 1998).

*B. thuringiensis* é um dos microorganismos entomopatógenos mais importantes do ponto de vista científico e industrial, devido a um conjunto de características desejáveis, principalmente ao seu modo de ação e a sua

especificidade. É a espécie mais estudada, tendo sido isolados inúmeros sorotipos, em diferentes regiões do mundo. Destacam-se por sua importância como biolarvicidas algumas sorovariedades como *aizawai*, *israelensis*, *kurstaki* e *tenebrionis*, todas com importante aplicação na saúde pública e na agricultura, sendo recomendadas para combater uma série relativamente grande de insetos das ordens Coleoptera, Diptera, Hemiptera e Lepidoptera (GLARE; O' CALLAGHAN, 1998; JOUNG; CÔTÉ, 2000).

*Bt* desenvolve-se em condições aeróbicas e em meios artificiais bastante simples. Sob certas restrições, como ausência de nutrientes ou acúmulo de metabólitos indesejáveis, esta bactéria pode manter-se em latência na forma de endósporos (YAMAMOTO; DEAN, 2000; BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2005). Dificilmente é encontrado causando epizootias naturais em insetos, pois não é considerado um entomopatógeno com grande agressividade e nem sempre esporula em insetos antes ou após sua morte (POLANCZYK; ALVES, 2003).

Esporos de *B. thuringiensis* podem ser isolados de diversos ambientes como solo, rizosfera, filoplano, água fresca, poeiras de grãos e de insetos, crustáceos, anelídeos e mamíferos insetívoros. (Figura 1).

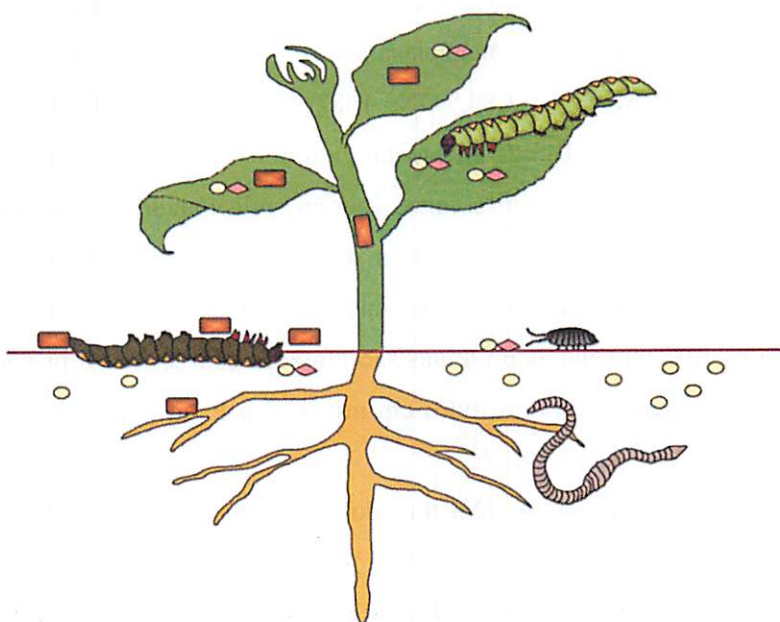


Figura 1. O complexo ecológico de Bt. Os vários locais no qual o Bt tem sido isolado e pode replicar estão mostrados esquematicamente. Possíveis locais de reprodução incluem o solo, a rizosfera, o filoplano ou outros tecidos da planta, ou dentro de insetos vivos ou mortos, ou dentro de outros invertebrados. Representando sua forma vegetativa por retângulo vermelho, sua forma de esporo por oval amarelo, e sua forma de cristal por losango rosa (RAYMOND et al., 2010).

Os cristais de Bt são mais resistentes à radiação ultravioleta que os esporos. Por isso a atividade inseticida reflete a atividade dos cristais, embora o número de esporos viáveis possa ser reduzido. Sendo o destino e a permanência dessa atividade no ambiente ainda não bem conhecido, mas alguns trabalhos mostram que as toxinas unem-se a elementos que as protegem da degradação por microorganismos, as mantendo com atividade inseticida. A meia vida dos esporos de Bt nas folhas, por exemplo, é de menos de 1 a 3 dias. Esse valor é bem inferior quando comparado com a meia vida dos esporos de Bt no solo que é de 100 a 200 dias (POLANCZYK; ALVES, 2003).

Quanto a sua localização, os genes podem estar contidos tanto nos cromossomos quanto nos megaplasmídeos (40-200MDa) ou em ambos (GONZÁLES; BROWN; CARLTON, 1982; SANCHIS et al., 1998). Além disso, existem cepas de Bt que apresentam um único gene codificador enquanto outras apresentam genes diferentes, porém relacionados (POLANCZYK; ALVES, 2003). Os genes e o produto de suas ampliações, ou seja, suas respectivas proteínas tóxicas recebem a mesma nomenclatura variando apenas a forma da escrita, ou seja, as proteínas são grafadas com apenas a primeira letra maiúscula e os genes grafados todos em minúsculas e em itálico. Por exemplo, proteínas Cry1Ab e gene *cry1Ab*.

Muitos pesquisadores têm tentado introduzir sistemas de classificação taxonômica para Bt, usando vários critérios, tais como sorotipagem, susceptibilidade de fagos e perfil plasmidial, e isso resultou na classificação de cerca de 100 subespécies.

Embora exista uma boa correlação entre a subespécie Bt e gama de hospedeiros de insetos a nível familiar, o relacionamento tende a quebrar no gênero e espécies, pois a maioria das cepas de Bt podem sintetizar mais de uma toxina, resultando em sobreposição de perfis complexos. Por exemplo, a maioria das cepas de *B. thuringiensis kurstaki* são específicas para insetos lepidópteros, enquanto as estirpes *israelensis* são específicos para dípteros e estirpes *morrisoni* são específicos para coleópteros. Outras cepas não são ativas contra esses insetos, mas são tóxicos para diversos invertebrados como as cepas de Bt contendo apenas toxinas do tipo Cry5 e tipo Cry6 são ativos contra nematóides (SANAHUJA et al., 2011).

No nível de gênero e espécie, é mais útil classificar funcionalmente as cepas de Bt com base nas proteínas tóxicas que produzem, pois esta é uma maneira mais lógica para definir a gama de hospedeiro. As toxinas podem ser



descritas em termos de suas seqüências de aminoácidos, estruturas de proteínas e modo de ação (CRICKMORE et al., 1998).

Inicialmente, cada gene recém caracterizado ou proteína recebeu uma designação arbitrária de seu descobridor. Mais tarde os genes das toxinas foram classificados em quatro tipos, com base na especificidade do inseto e homologia de seqüência (HOFTEY; WHITLEY, 1989). Genes *cry* tipo I codificam proteínas de 130 kDa, e são usualmente específicos para larvas de lepidópteros, genes *cry* II codificam para proteínas de 70 kDa específico para lepidópteros e larvas de dípteros. Genes *cry* III codificam para proteínas de 70 kDa específico para larvas de coleópteros e genes *cry* IV são específicos para larvas de dípteros. O sistema foi estendido para incluir os genes de tipo V, que codificam para proteínas de 81 kDa eficazes contra larvas de lepidópteros e coleópteros (TAILOR et al., 1992).

Mas, algumas inconsistências foram encontradas no presente regime. Por exemplo: as proteínas Cry tipo I foram designados como lepidópteros-específicas, porém CryIAb e CryIC apresentam atividade dupla tanto contra larvas de dípteros e lepidópteros. CryIB apresentou-se tóxico para dípteros, coleópteros e larvas de lepidópteros.

Portanto, um novo sistema de classificação, baseado exclusivamente na similaridade de aminoácidos, foi proposto e está sendo usado atualmente (CRICKMORE et al., 1998). Proteínas Cry e Cyt foram atribuídas a uma classe, se a sua similaridade de seqüência é maior que 45% do que os outros membros da classe. Neste sistema, numerais romanos foram trocados por numerais arábicos como a primeira classe. Para cada toxina é atribuído um nome exclusivo com todas as quatro classes, ou seja, primário, secundário, terciário e quaternário (por exemplo, Cry23Aa1). A inclusão da terceira e quarta classe pode ser opcional. A nova toxina poderia, portanto, ser simplesmente referido como Cry23A. Proteínas com a mesma classificação primária frequentemente

afetam a mesma ordem de insetos. Aqueles com classe secundária e terciária diferentes podem ter diferentes potência e direcionamento dentro de uma ordem. Na classe quaternária, as diferenças podem ser devido a mutações pontuais dispersas. Essa classe foi criada para grupos alélicos de genes que codificam para toxinas conhecidas que diferem apenas ligeiramente. As três primeiras classes representam cerca de 40, 78 e 95% de identidade de aminoácidos (CRICKMORE et al., 2011).

Bt pode produzir, além das toxinas inseticidas, proteínas tóxicas não desejáveis para a agricultura. Um exemplo são as exotoxinas. Toxinas termoestáveis que possuem amplo espectro de ação contra insetos, mas também há toxicidade contra vertebrados. Devido a isso, a maioria dos bioinseticidas à base de Bt utiliza isolados ou subespécies que não produzem essas toxinas (GLARE; O'CALLAGHAM, 2000).

Além das endotoxinas Cry e Cyt, outra classe de proteínas que podem contribuir para a virulência de *B. thuringiensis* em insetos-praga específicos são as proteínas vegetativas, Vip, que possuem, assim como as proteínas formadoras de cristais, elevada toxicidade para lepidópteros como *S. frugiperda* e *H. zea* (GLARE; O'CALLAGHAM, 2000).

### **2.3.1 Proteínas Cry**

Proteínas Cry são  $\delta$ -endotoxinas especialmente tóxicas para as ordens de insetos Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera e Diptera, e também aos nematóides. A definição de uma proteína Cry é bastante ampla: uma inclusão protéica parasporal (cristal) de *B. thuringiensis* que exhibe algum efeito tóxico experimentalmente verificável para um organismo alvo ou qualquer proteína que tenha similaridade de seqüência para uma proteína Cry conhecida (CRICKMORE et al., 1998).

Os membros da família do maior e mais estudado grupo de proteínas Bt, as Cry, são moléculas globulares contendo três domínios estruturais ligados por ligações simples. Uma característica particular dos membros desta família é a presença de protoxinas que possuem tamanho aproximado do dobro da maioria das toxinas. A extensão C-terminal encontrada nas longas protoxinas é dispensável para a toxicidade e acredita-se que essa região exerce um papel na formação dos corpos de inclusão do cristal dentro da bactéria (DE MAAGD; BRAVO; CRICKMORE, 2001).

Apesar da sua diversidade de seqüência, todas as proteínas Cry compartilham essa estrutura terciária, como exemplificado pelas estruturas de seis proteínas Cry mostradas por cristalografia de raio X (Cry1Aa, Cry2Aa, Cry3Aa, Cry3Bb, Cry4Aa e Cry4Ba) (Figura 2) (DE MAAGD; BRAVO; CRICKMORE, 2001).

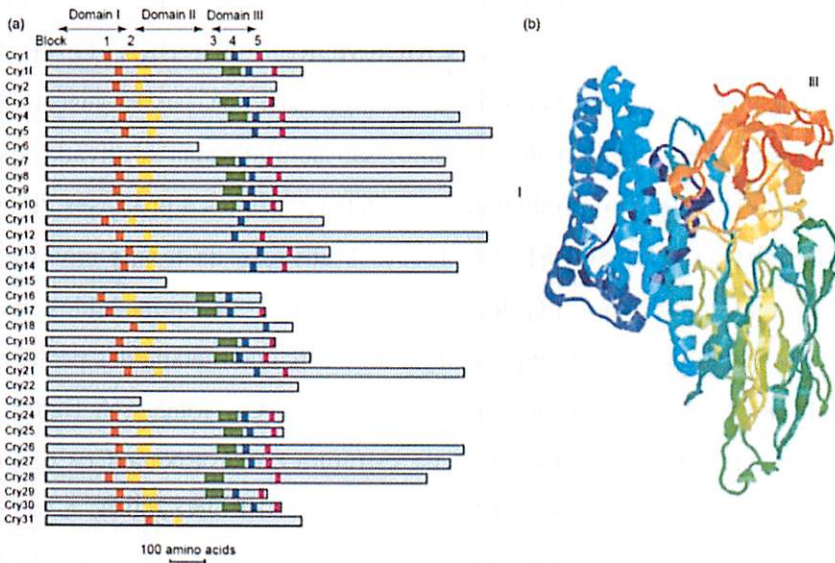


Figura 2. Estrutura dos três domínios das proteínas Cry. (a) Estrutura primária, mostrando a organização do domínio dos membros representativos de cada família Cry. b) Estrutura terciária conservada, mostrando a posição dos três domínios. Fonte: De Maagd, Bravo e Crickmore (2001).

Essa semelhança na estrutura sugere um modo de ação das proteínas Cry. O domínio N-terminal (Domínio I) é composto de sete  $\alpha$ -hélices, no qual a hélice central  $\alpha$ -5 é hidrofóbica e é cercada por outras seis hélices anfipáticas sendo este domínio helicoidal o responsável pela inserção na membrana e formação dos poros. O Domínio II é constituído de três  $\beta$ -folhas anti-paralelas com as regiões “loop” expostas e o Domínio III é um  $\beta$ -sanduíche (LI; CARROL; ELLAR, 1991; GROCHULSKI et al., 1995; MORSE; YAMAMOTO; STROUD, 2001; GALITSKY et al., 2001; BOONSERM et al., 2005, 2006). As regiões expostas nos Domínios II e III estão envolvidas na ligação ao receptor (BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2005).

O modo de ação das toxinas Cry tem sido caracterizado principalmente em insetos lepidópteros. Estudos mencionam que a ação primária dessa toxina é lisar as células epiteliais do intestino médio do inseto-alvo pela formação de poros na membrana microvilosa apical das células do mesêntero (ARONSON; SHAI, 2001; DE MAAGD; BRAVO; CRICKMORE, 2001; BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2005). As protoxinas inativas ingeridas por larvas suscetíveis dissolvem-se no meio alcalino do intestino, são solubilizadas e clivadas por proteases do intestino médio produzindo proteínas resistentes à proteases de 60-70 kDa (BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2005). A ativação da toxina envolve a remoção proteolítica de um peptídeo N-terminal (25-30 aminoácidos para toxinas Cry1, 58 para Cry3A e 49 para Cry2Aa) e cerca de metade das proteínas restantes da porção C-terminal, no caso de protoxinas Cry longas. A figura. 3 mostra uma representação esquemática da estrutura da protoxina Cry e seus sítios de clivagem das proteases (BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2007). A toxina ativada então se liga a receptores de glicoproteínas específicos na borda da membrana das células epiteliais do intestino médio (DE MAAGD; BRAVO; CRICKMORE, 2001; BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2005) antes de inserir na membrana. Esses receptores, na verdade, desempenham um papel fundamental

na determinação de suscetibilidade/resistência a uma toxina particular de *B. thuringiensis* estando sua natureza sob intensa investigação (ALCÂNTARA et al., 2004). A inserção da toxina se dá de forma rápida e irreversível, levando à formação de poros líticos nas microvilosidades da membrana apical (ARONSON; SHAI, 2001; BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2005). Posteriormente ocorre a lise celular e, muito provavelmente, resulta na permeabilidade seletiva de cátions. Ocorre então, a ruptura do epitélio do intestino médio, liberando o conteúdo da célula, fornecendo um meio com esporos germinando e como consequência uma septicemia grave (DE MAAGD; BRAVO; CRICKMORE, 2001; BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2005) e/ou levando a paralisia do intestino, cessando a alimentação e como consequência a morte por fome (inanição), o que ocorre geralmente após 1-3 dias (ALI et al., 2010).

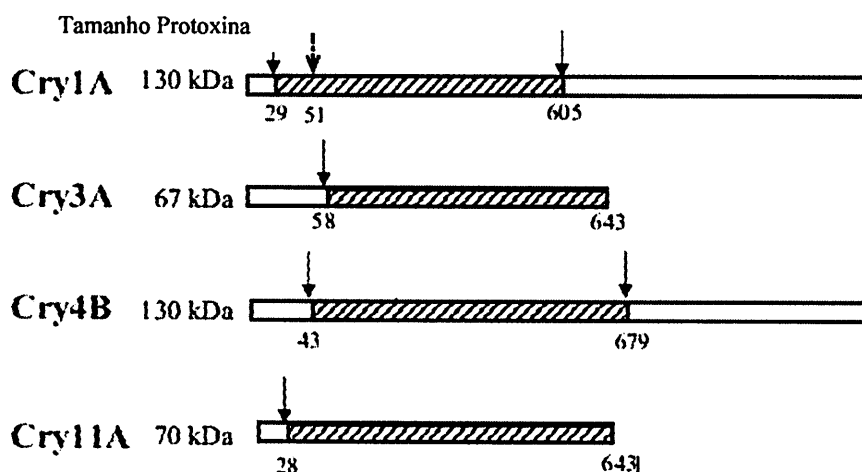


Figura 3. Comprimento relativo das protoxinas Cry e as posições da digestão das proteases. As caixas brancas representam a protoxina e as caixas listradas representam a toxina ativa. As setas cheias mostram os sítios de clivagem amino-e carboxi-terminal da toxina ativada. As setas pontilhadas mostram as clivagens intramoleculares. O corte de Cry1A na posição 51 resultou na perda da hélice  $\alpha$ -1 e na formação do pré-poro. Fonte: Bravo, Gill e Soberón (2007).

Uma característica interessante da ativação da toxina Cry é o processamento do final N-terminal. A estrutura tridimensional da protoxina Cry2Aa revelou que as duas  $\alpha$ -hélices da região N-terminal obstrui uma região da toxina envolvida na interação com o receptor (MORSE; YAMAMOTO; STROUD, 2001). Além disso, verificou-se que um Cry1Ac mutante que reteve o final N-terminal, após tratamento com tripsina ligou-se a membrana inespecificamente de *Manduca sexta*, e foi incapaz de formar poros nas vesículas do intestino médio (BBMV) das mesmas (BRAVO et al., 2002). Assim, o processamento final N-terminal de protoxinas Cry pode deixar à mostra o fragmento hidrofóbico do Domínio II envolvido na interação toxina-receptor ou toxina-membrana (BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2007).

Meenakshisundaram e Gujar (1998) sugerem que diferenças no grau de solubilização de diferentes toxinas possam explicar as diferenças na toxicidade de várias proteínas e que a diminuição da solubilidade pode ser um dos possíveis mecanismos de resistência dos insetos às proteínas de *B. thuringiensis*. Embora a ligação das toxinas Cry aos receptores determine a sensibilidade da espécie a várias toxinas, há exceções distintas. Por exemplo, Cry1Ac liga-se bem com os receptores de membrana da lagarta da beterraba (*Spodoptera exigua*), mas há muito pouca toxicidade a este inseto (GARCZYNSKI; CRIM; ADANG, 1991). Já a proteína Cry1Ab é mais tóxica para o mariposa cigana (*Lymantria dispar*) que Cry1Ac, mas não se liga bem aos receptores da membrana (WOLFERSBERGER, 1990).

### 2.3.2 Proteínas Cyt

As toxinas Cyt são  $\delta$ -endotoxinas encontradas principalmente em cepas de Bt ativas contra dípteros. Da mesma forma de Cry, proteínas Cyt denotam uma inclusão protéica parasporal (cristal) de *B. thuringiensis* que exibe atividade

hemolítica, ou qualquer outra proteína que tenha similaridade de sequência óbvia para uma proteína Cyt conhecida (CRICKMORE et al., 1998). São toxinas de menor peso molecular (25-28 kDa), denominadas de endotoxinas citolíticas (POLANCZYK; ALVES, 2003).

A estrutura dessas proteínas é dada por um domínio  $\alpha$ - $\beta$  único, composto de duas camadas exteriores de grampos  $\alpha$ -hélice acondicionadas em torno de um  $\beta$ -folha (LI; PANDELAKIS; ELLAR, 1996, Fig. 4).



Figura 4. Estrutura tridimensional da toxina inseticida Cyt2A de *Bacillus thuringiensis*.  
Fonte: Li, Pandelakis e Ellar (1996).

Como ocorre com as Cry, as toxinas Cyt também são sintetizadas como protoxinas e necessitam de remoção de pequenas porções do N-terminal e C-terminal para que ocorra sua ativação (LI; PANDELAKIS; ELLAR, 1996). No caso de Cyt2Aa, 32 aminoácidos da porção N-terminal e 15 aminoácidos da porção final C-terminal são removidos pela proteinase K produzindo uma proteína monômera com atividade hemolítica. Mas diferentemente do modo de

ação das Cry, as toxinas Cyt não se ligam a proteínas receptoras. Essas toxinas têm interação direta com a membrana lipídica através da inserção e formação dos poros (THOMAS; ELLAR, 1983; GILL; SINGH; HORNUNG, 1987; LI; PANDELAKIS; ELLAR, 1996; PROMDONKOY; ELLAR, 2003) ou destruição da membrana como uma interação detergente (BUTKO, 2003).

Já foi documentado em campo com insetos lepidoptera o aparecimento de resistência a Bt nos insetos (FERRÉ; VAN RIE, 2002). No entanto, nenhuma resistência foi observada em espécies de mosquitos controlado por *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, Bti (BECKER, 2000). Essas bactérias produzem inclusões cristalinas compostas das toxinas Cry4Aa, Cry4Ba, Cry10Aa, Cry11Aa, Cyt1Aa E Cyt2Ba (BERRY et al., 2002), sendo a falta de resistência ao Bti devido à presença da proteína Cyt1Aa no cristal (GEORGHIOU; WIRTH, 1997). O sinergismo entre Cyt1Aa e as proteínas Cry de Bti tem sido observado (CHILCOTT; ELLAR, 1988; ANGSUTHANASOMBAT; CRICKMORE; ELLAR, 1992; GEORGHIOU; WIRTH, 1997) sendo a atividade dos cristais em Bti muito maior do que as proteínas isoladas. Pérez et al. (2005) demonstrou que a toxina Cry11Aa e a proteína Cyt1Aa se sinergizam, funcionando a toxina Cyt como uma molécula receptora. A interação de Cry11Aa e Cyt1Aa é similar as ligações das Cry aos receptores naturais, sendo esse o primeiro exemplo de uma bactéria entomopatogênica que não produz apenas a toxina mas também o receptor funcional, promovendo assim a ligação da toxina na membrana e a toxicidade ao mosquito. Na figura 5 pode-se observar o modo de ação das proteínas Cry em lepidópteros e o sinergismos entre Cry e Cyt em dípteros.



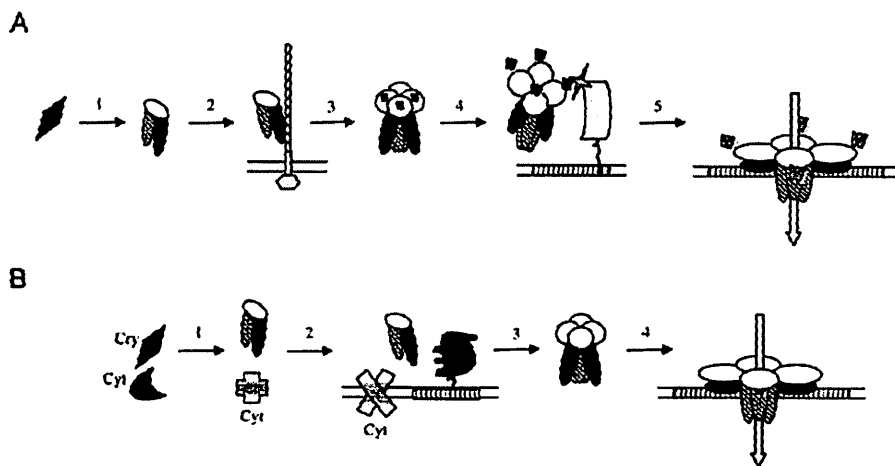


Figura 5. Modelo do modo de ação das toxinas Cry e Cyt. (A) Interação sequencial de toxinas Cry em espécies de lepidópteros. (1) Solubilização e ativação da toxina, (2) ligação da toxina monomérica Cry no primeiro receptor, induzindo a mudança conformacional, (3) a formação de oligômero; (4) ligação da toxina oligomérica no segundo receptor, ocorrendo uma mudança conformacional na toxina para um estado globular, (5) inserção da toxina oligomérica na membrana lipídica e formação do poro. (B) Papel das toxinas Cry e Cyt na intoxicação de larvas de dípteros. (1) Solubilização e ativação das toxinas Cry e Cyt, (2) inserção da toxina Cyt na membrana e ligação da toxina Cry aos receptores de membrana (ALP ou toxinas Cyt), (3) oligomerização da toxina Cry; (4) inserção do oligômero na membrana, resultando em formação de poros. Fonte: Bravo, Gill e Soberón (2007).

Até o momento, as toxinas Cyt descritas estão distribuídas em três classes, Cyt1, Cyt2 e Cyt3 (CRICKMORE et al., 2011), sendo Cyt1 e Cyt2 duas famílias altamente relacionadas (CRICKMORE et al., 1998).

### 2.3.3 Proteínas Vip

Desde a descoberta da toxina Vip por Estruch et al. (1996), dois grandes grupos da toxinas têm sido identificados em *B. thuringiensis*. Um grupo de toxinas Vip consiste de toxinas binárias que são feitas de dois componentes: Vip1 e Vip2 (WARREN, 1997) tendo 100 kDa e 52 kDa, respectivamente. São

tóxicas para certas espécies de coleópteros (ESPINASSE et al., 2003), sendo altamente inseticida para um inseto agronomicamente importante, o crisomelídeo do milho (*Diabrotica virgifera*), mas não mostrando qualquer atividade inseticida para lepidópteros (HAN et al., 1999).

O outro grupo consiste nas toxinas Vip3, não tendo similaridade de sequência com Vip1 ou Vip2. Vip3A consiste de uma proteína de 88,5 kDa ativa contra um amplo espectro de insetos lepidópteros, incluindo *A. ipsilon*, *S. exigua*, *S. frugiperda*, *H. virescens*, e *H. zea*, alguns dos quais têm baixa suscetibilidade a maioria das  $\delta$ -endotoxinas (ESTRUCH et al., 1996; YU et al., 1997).

Baseado em uma série de testes *in vitro* e *in vivo*, Vip3A e Cry diferem em vários passos necessários para a atividade inseticida apesar de ambas serem proteínas Bt formadoras de poros. A proteína Vip3A não possui nenhuma homologia com proteínas Cry, tendo exclusivo mecanismo de ação inseticida. É produzida em uma fase de crescimento diferente do Bt, se liga a receptores independentes, forma poros com propriedades únicas e mata todos os insetos resistentes a proteína Cry testado dentro da atividade de espectro conhecido (KURTZ, 2010).

Além disso, algumas cepas de Bt resistentes as proteínas Cry mortas pela Vip3A apresentam resistência cruzada a diversas outras proteínas Cry e têm múltiplos mecanismos de resistência relacionados a ligações reduzidas e alterações na atividade proteolítica, sendo essas características essenciais para o sucesso da toxicidade de ambas as proteínas Bt (YU et al., 1997; LEE et al., 2003; LEE; MILES; CHEN, 2006; SENA; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ; FERRÉ, 2009; JACKSON et al., 2007; ANILKUMAR et al, 2008).

Todos os dados gerados, amplo espectro e diferentes modos de ação inseticida de genes *cry*, indicam Vip3A como a proteína favorável para complementar as proteínas Cry na piramidação de genes em transgênicos, ou

seja, dois ou mais genes inseridos em um único organismo, como estratégia do aumento de resistência por meio do controle de insetos resistentes às proteínas Cry. Essa estratégia pode ser usada para o manejo de resistência das culturas transgênicas aos insetos alvo.

#### **2.3.4 Aplicações Agronômicas do Bt: Bioinseticidas e Culturas Bt**

As duas maiores importâncias das toxinas de Bt são: o controle de pragas no campo e vetores de doenças humanas através de bioinseticidas, e o desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas resistentes a insetos.

Em 1938 foi iniciada a produção comercial da bactéria *B. thuringiensis*, na França com o lançamento no mercado do bioinseticida Sporeine (LAMBERT; PEFEROEN, 1992). Posteriores pesquisas de Steinhaus (1951) levaram a um interesse renovado nesses produtos, e como resultado, defensivos agrícolas mais potentes, como Thuricide ® e Dipel ® foram introduzidas.

Bt é o principal agente de controle biológico utilizado atualmente, sendo responsável por aproximadamente 2% do mercado mundial de inseticidas (LAMBERT et al., 1992; SCHNEPF et al., 1998). É a bactéria responsável por mais de 90% do total das vendas de biopesticida (GLARE; O'CALLAGHAM, 2000), tendo sido usada no campo durante os últimos 50 anos (ALI et al., 2010). Os produtos que contêm misturas de esporos e cristais de Bt são comercializados para controlar uma gama de diferentes insetos durante suas fases de larva, incluindo lagartas, besouros e mosquitos (ROH et al., 2007).

Uma das grandes desvantagens dos pesticidas é a pequena janela de eficácia, e o fato das mudanças climáticas podem tornar inútil a pulverização do veneno em questão de horas. Pulverizações com Bt devem ser reaplicadas várias vezes na época de cultivo para atingir toda a população de larvas de pragas, aumentando a quantidade de produto que deve ser usado e o combustível

necessário para a pulverização. Além disso, pulverizações de biopesticidas têm pouco impacto sobre as chamadas pragas crípticas, ou seja, insetos sugadores de seiva e as larvas que se alimentam próximo às raízes (SANAHUJA et al., 2011).

Uma possível solução para este problema foi desenvolvido na meados dos anos 1980, quando os cientistas introduziram genes *cry* de Bt em plantas de tabaco e tomate e as proteínas foram expressas diretamente nos tecidos da planta. A empresa belga Plant Genetic Systems foi pioneira no interesse comercial da tecnologia transgênica do Bt, mas nenhuma proteína Cry foi detectada na primeira geração de plantas transgênicas experimentais (FISCHHOFF et al., 1987; VAECK et al., 1987; PERLAK et al., 1991).

Depois de bons resultados em testes de laboratório, os primeiros testes de campo com tabaco transgênico Bt, ou seja, inserções de genes de *Bacillus thuringiensis* para a resistência de pragas, foram conduzidos nos Estados Unidos e na França em 1986. Considerando que nunca foi possível a exploração comercial da variedade de tabaco Bt desenvolvido, as plantas de batata transgênicas expressando Cry3A de Bt var. *tenebrionis* para o controle da lavoura contra o besouro da batata do Colorado (*Leptinotarsa decemlineata*) foram destinados para o desenvolvimento comercial (PERLAK et al., 1993).

Em 1995, a Agência de Proteção Ambiental dos EUA (EPA) aprovou o primeiro registo de batata, milho e algodão Bt. O primeiro a chegar ao mercado foi a variedade de batata Monsanto NewLeaf expressando Cry3A, seguido rapidamente por dois híbridos de milho transgênico expressando Cry1Ab para proteger contra a broca do milho europeia, KnockOut pela Syngenta (Basel, Suíça) e NatureGard pela Mycogen (ambos evento 176). A multinacional Monsanto também lançou as variedades de algodão Bollgard e Ingard (eventos 531, 757, 1076) expressando a toxina Cry1Ac modificada. Duas outras variedades de milho Bt expressando Cry1Ab foram liberados logo em seguida: Agrisure CB pela Northrup King (evento Bt11) e YieldGard (evento MON 810)

pela Monsanto. A batata NewLeaf e seus sucessores (NewLeaf Y , NewLeaf Plus) foram retirados do mercado em 2002 e as variedades de milho contendo o evento 176 foram posteriormente retiradas e substituídas por produtos mais rentáveis (SANAHUJA et al., 2011).

Em 1998, a adoção de culturas Bt aumentaram de forma significativa, mostrando o impacto positivo da tecnologia dos transgênicos Bt na agricultura e no meio ambiente. Em 1998, a EPA aprovou uma linha de tomate resistente a insetos (evento 5345) expressando Cry1Ac e em 2001 a variedade do milho Herculex desenvolvido em conjunto pela Pioneer Hi-Bred e Dow AgroSciences (evento TC 1507) expressando Cry1F, protegendo as plantas contra lagarta rosca (*Agrotis ipsilon*), lagarta do cartucho (*Spodoptera frugiperda*) e o broca do milho europeu (*Ostrinia nubilalis*). Um novo marco foi alcançado em 2002 com a aprovação do algodão da Monsanto Bollgard II (evento 15.985), que foram expressas duas toxinas Bt Cry1Ac , Cry2Ab, e mais tarde YieldGard Rootworm (evento MON 863) expressando uma variante sintética do gene *cry3Bb1* de Bt *subsp. kumamotoensis* oferecendo resistência contra crisomelídeo do milho (*Diabrotica virgifera*). A primeira variedade desenvolvida pelo cruzamento de duas variedades Bt lançadas anteriormente foi lançada em 2003 com a cultivar YieldGard Plus (evento MON 810 + MON 863) pela Monsanto, expressando Cry1Ab1 e Cry3Bb1 (SANAHUJA et al., 2011).

Os Estados Unidos está entusiasticamente envolvido no desenvolvimento da agricultura Bt e tem de longe a maior quantidade de terras utilizadas para cultivos Bt. No entanto, culturas Bt são cultivadas em outros 25 países e o número de países que adotaram lavouras Bt e a quantidade de terras retiradas para o seu cultivo tem apresentado uma tendência ascendente e continua pelos 15 anos. A agricultura Bt está em expansão em todos os continentes, exceto o europeu. A área total global dedicada a cultivos Bt em 2009 foi superior a 50 milhões de hectares (36% de todas as culturas GM),

composto de 21,7 milhões de hectares de culturas apenas Bt e 28,7 milhões de hectares de cultivos de Bt associados com tolerância a herbicidas (JAMES, 2010).

Embora o Brasil e a Argentina detenham atualmente o segundo lugar e terceiro lugar no ranking mundial para a agricultura Bt (JAMES, 2010), China e Índia têm tido uma adoção mais rápida. Isto porque ambos são grandes produtores de algodão e a China em particular, é a maior produtora de arroz. Ensaio com arroz Bt no campo foram realizados, pela primeira vez, na China em 1998. Uma série de linhagens de arroz Bt transformados com genes *cryIA* modificado, *cryIAb* e *cryIAc* foram avaliados em experimentos de larga escala em 2007 (HUANG et al., 2007) e foram aprovados para liberação comercial em novembro de 2009 embora o cultivo em larga escala ainda esteja pendente (SANAHUJA et al., 2011).

No Brasil, cultivares transgênicas de algodão, milho e soja resistentes a pragas e/ou tolerantes a herbicidas estão no mercado após longos estudos, testes e liberação pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), que é responsável por prestar apoio técnico consultivo ao governo federal na formulação, atualização e implementação da Política Nacional de Biossegurança relativa a organismos geneticamente modificados (OGM), bem como, estabelecer normas técnicas de segurança e pareceres técnicos referentes à proteção da saúde humana, dos organismos vivos e do meio ambiente, para atividades que envolvam a construção, experimentação, cultivo, manipulação, transporte, comercialização, consumo, armazenamento, liberação e descarte de OGM e derivados (CTNBio, 2011).

Segundo dados da CTNBio (2011), o primeiro algodão transgênico liberado para comercialização pela CTNBio se deu em 2005, com um evento da Monsanto, onde a planta modificada apresentava resistência a insetos-praga. Em 2009, foi liberado o primeiro algodão transgênico com piramidação de genes de

resistência a pragas e tolerância a herbicidas pela Dow AgroSciences. Até o momento foram liberados 8 eventos de algodão transgênico. Sendo 5 deles algodão Bt. O último evento aprovado para comercialização foi em 2011 com a liberação do algodão TwinLink, da Bayer S.A com a inserção dos genes *cry1Ab* e *cry2Ae*.

Já a soja transgênica teve sua primeira liberação no Brasil em 1998 e hoje existem 5 aprovações comerciais, mas apenas em 2010 ocorreu a liberação da soja Bt (toxina Cry1Ac) associada a tolerância a herbicida, pela Monsanto (CTNBio, 2011).

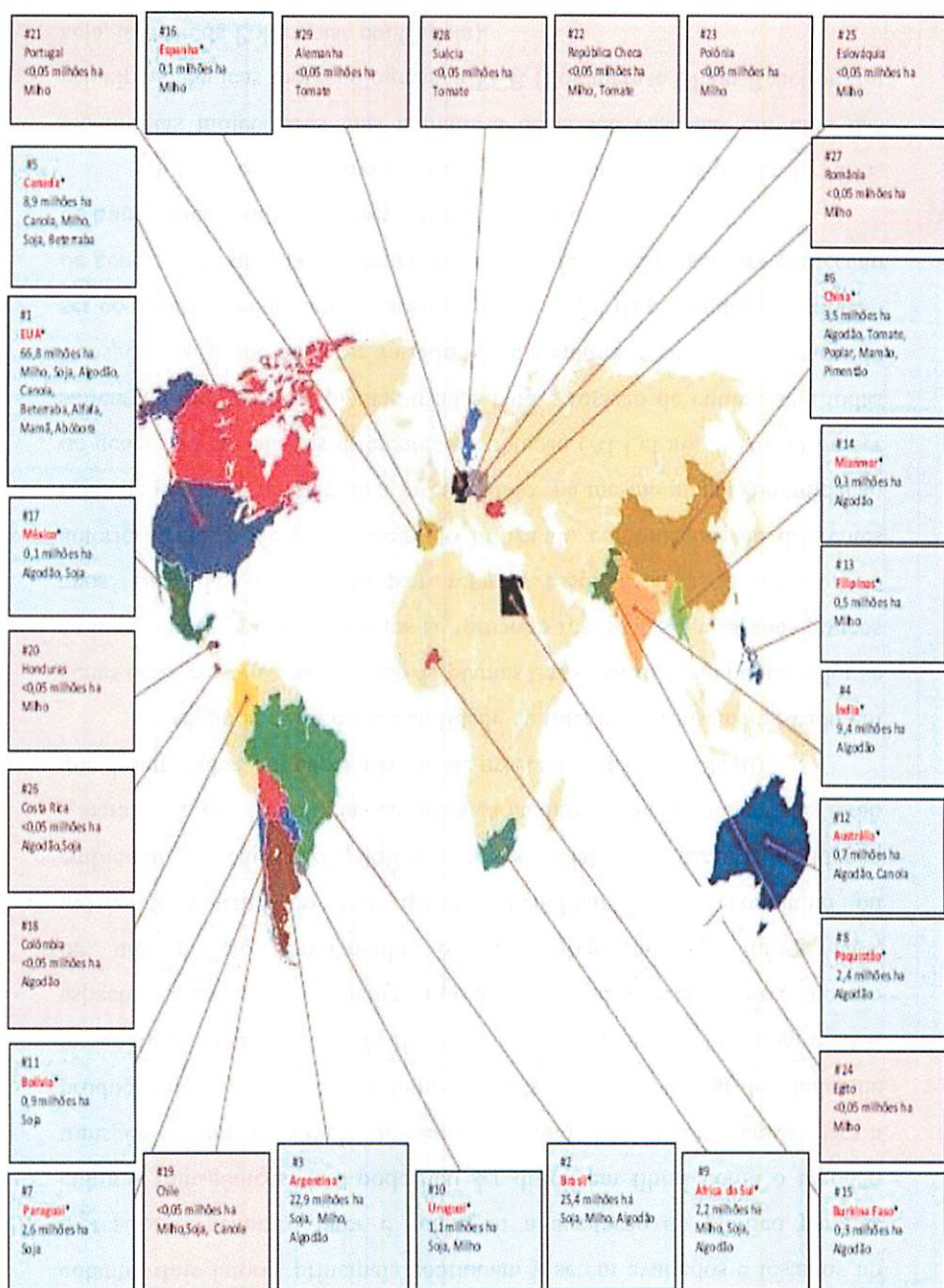
O milho é a cultura com maior eventos transgênicos liberados para comercialização no Brasil. Dos 15 eventos liberados de 2007 a 2010, 12 são milho Bt sendo sua grande maioria genes *cry*, mas a multinacional Syngenta, em 2009 e em 2010 lançou culturas de milhos Bt com o gene *vip3*. Além dessa empresa, Monsanto, Dow AgroSciences e Du Point são as multinacionais responsáveis pelo desenvolvimento de milhos geneticamente modificados para resistência a insetos-praga e aprovados para comercialização no Brasil (CTNBio, 2011).

Uma das legislações da CTNBio recomenda que as lavouras transgênicas devem estar a pelo menos 100m de distância das divisas da propriedade vizinha ou, alternativamente, devem ter 20m de bordadura cultivada com milho não Bt, de porte e ciclo similar ao geneticamente modificado. Sugere-se também ter o plantio simultâneo, na distância máxima de 1500m, de pelo menos 10% da área com milho não transgênico para servir de refúgio e área de multiplicação do inseto (CTNBio, 2011), retardando assim a resistência da *Spodoptera frugiperda* ao milho Bt.

Em 2010, houve um crescimento de 10%, (14 milhões de hectares) de plantação de transgênico comparado a 2009. Em 29 países, 15,4 milhões de agricultores plantando 148 milhões de hectares de diferentes culturas

transgênicas (Figura 6), sendo dos 29, 19 países em desenvolvimento e 10 países industrializados. Um número recorde: oito países da União Européia fizeram plantações biotecnológicas em 2010, seis países continuaram a plantar 91.193 hectares de milho Bt, liderado pela Espanha; três países, a República Checa, a Suécia (o primeiro país escandinavo a plantar uma cultura de biotecnologia) e Alemanha plantaram pequenas áreas de batata "Amflora", totalizando 450 hectares nos três países para a multiplicação de sementes e produção comercial inicial. "Amflora", aprovada em 2010, é a primeira safra de transgênicos a ser aprovado pela UE para o plantio em 13 anos (JAMES, 2010).





□ \*17 mega-países plantando 50.000 hectares, ou mais, de culturas transgênicas.

Figura 6 Mapa global de países e mega-países produtores de culturas tecnológicas.

Fonte: James (2010)

Está muito claro que a tecnologia de transformação avançou para a fase em que a proteção dramática ao ataque de insetos pode ser demonstrado em uma série de importantes culturas como algodão, soja, milho e arroz. No entanto, dois fatores principais continuam a serem avaliados e testados no mercado. O primeiro fator é conseguir a aceitação do público para as culturas transgênicas. Isto pode não ser difícil em fibras como o algodão transgênico, mas provavelmente exigirá ensino público considerável para a produção de alimentos como: tomate, batata, arroz etc, apesar dos dados de toxicologia já existentes de *B. thuringiensis*. Tal como acontece com muitos aspectos da engenharia genética, a política pode ter impacto sobre o sucesso de um projeto envolvendo o desenvolvimento de transgênicos, independentemente do seu aparente benefício social, econômico ou ambiental. A educação pública será essencial para garantir a adoção generalizada das tecnologias da genética na agricultura, e os cientistas terão que desempenhar um papel ativo neste processo (ALI et al., 2010).

A segunda delas é a durabilidade da tolerância a insetos baseado em genes de *B. thuringiensis*. O uso de plantas transgênicas terão pouco valor se as importantes pragas de insetos se tornarem resistentes a elas após poucos anos. Uma das alternativas para retardar esse processo, já mencionado anteriormente, pode ser conseguido utilizando combinações de diferentes tipos de genes de resistência a insetos juntos na mesma planta (piramidação de genes) ou em plantas diferentes em rotação (ALI et al., 2010). Deve ser salientado que, caso as plantas usadas para a rotação de cultura seja todas transgênicas, o que deve ser variado não é a cultura, e sim, o gene podendo ser considerado então uma rotação de genes. Além da piramidação e rotação de genes, outra alternativa seria a descoberta de novos genes para confecção de transgênicos com diferentes inserções genéticas.

A prospeção de novos genes de *B. thuringiensis* depende de várias tecnologias moleculares mas a maioria delas são baseadas em uma das principais técnicas biotecnológicas, a PCR (Polymerase Chain Reaction, ou seja, Reação da Polimerase em Cadeia).

## 2.4 Técnicas moleculares aplicadas à prospecção, caracterização, estudo da diversidade gênica e identificação bacteriana

A técnica de PCR é executada inteiramente *in vitro* sem o uso de células, possibilitando a síntese de fragmentos de DNA, usando a enzima *Taq DNA polimerase*, que é termoestável. A reação se baseia no pareamento de um par de oligonucleotídeos (iniciadores ou *primers*) na fita de DNA alvo e extensão do fragmento delimitado pela sequência de fita dupla formada entre a fita de DNA e o iniciador. A extensão desse fragmento previamente conhecido se dá a partir da extremidade 3' OH livre do iniciador. Esses iniciadores são sintetizados artificialmente de modo que suas sequências sejam complementares as sequências extremas do fragmento desejado (FERREIRA; GRATAPAGLIA, 1998; NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004).

Várias metodologias moleculares empregadas para a caracterização gênica de cepas de *B. thuringiensis* para genes *cry*, *cyt*, e *vip* (BRAVO et al., 1998; FRANCO-RIVERA et al., 2004; FANG et al., 2007; ALLWIN; KENNEDY; RADHAKRISHNAN, 2007; GUERCHICOFF; UGALDE; RUBINSTEIN, 1997) tem como base a análise com PCR (denominadas genericamente como *PCR-based DNA fringerprinting techiques*), sendo aplicadas a estudos de diversidade e identificação de estirpes de bactérias e isolados de fungos, e até o presente momento, o maior número de trabalhos relata o uso dos marcadores RAPD, AFLP e rep-PCR (BRADSHAW; FOSTER; MONAHAN, 2006; BRIGDE; ARORA, 1998; BRUIJN, 1992; MORTON et al., 2003). Outra modificação da técnica da PCR que também vem sendo utilizada de maneira crescente nos últimos anos para identificação bacteriana é o multiplex PCR (mPCR).

### 2.4.1 rep-PCR

Os marcadores *repetitive sequence based-PCR* (rep-PCR) foram, originalmente, desenvolvidos para o estudo de diversidade e identificação de

bactérias (BRUJIN, 1992; VERSALOVIC; KOEUTH; LUPSKI, 1991; VERSALOVIC et al., 1994). Essa técnica tem atraído muita atenção devido à sua reprodutibilidade estável e capacidade discriminatória vantajosa (LIN et al., 2008) Os elementos repetitivos parecem estar localizados em distintas posições intergênicas no genoma, em ambas as orientações, e supõe-se que, por serem associadas a graus elevados de polimorfismo, essas regiões gênicas tenham participação em processos de evolução adaptativa, mediando a interação dos microrganismos com ambientes hostis. Existem três famílias principais de elementos, incluindo as sequências *Repetitive Extragenic Palindromic* (REP), *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* (Eric) e elementos BOX, para as quais foram desenvolvidos e otimizados *primers* (BRUJIN, 1992; VERSALOVIC; KOEUTH; LUPSKI, 1991; VERSALOVIC et al., 1994), que vêm sendo amplamente utilizados desde então.

A função real desses elementos altamente repetidos e conservados permanecem um enigma. Apesar de seu envolvimento na estabilização do mRNA (NEWBURY et al., 1987), no acoplamento de translação entre os genes (STERN; PROSSNITZ; AMES, 1988), na recombinação homóloga (SHYAMALA; SCHNEIDER; AMES, 1990), na organização dos cromossomos e na ligação das proteínas HU, DNA girase e DNA polimerase I (GILSON; PERRIN; HOFNUNG, 1990; HIGGINS et al., 1982; YANG; AMES, 1988, 1990), nenhuma função tem sido sugerida para explicar satisfatoriamente a sua conservação na sequência de DNA e/ou sua distribuição ubíqua ter emergido (HULTON; HIGGINS; SHARP, 1991). Portanto, a sugestão também feita é que estes elementos repetidos representam sequências "egoístas" de DNA que são mantidas e propagadas através da conversão do gene (HIGGINS; McLAREN; NEWBURY, 1988).

Segundo Lin et al. (2008), as sequências repetitivas de DNA usadas para a construção dos *primers* nessa técnica de tipagem geralmente se dispersam por todo o genoma de diversas espécies bacterianas. As diferenças

em tamanhos de banda representam polimorfismos nas distâncias entre os elementos repetitivos de diferentes linhagens (SHUHAIMI et al., 2001).

#### **2.4.2 Multiplex PCR**

Nessa técnica se utilizam mais de um par de *primers* na mesma reação, possibilitando a amplificação simultânea de sequências de DNA (TANG; PERSING, 1999) podendo ser utilizadas para evitar resultados falso-negativos com a utilização de um controle interno na PCR (IAC - Internal Amplification Control) (KLERKS; ZIJLSTRA; VAN BRUGGEN, 2004).

O IAC é uma sequência não alvo, colocada junto com a amostra na reação, e que é amplificada simultaneamente com a sequência alvo. Em uma PCR sem um IAC, uma resposta negativa (ausência de banda ou sinal) pode significar a ausência da sequência alvo na reação, mas pode significar, também, que a reação foi inibida devido ao mau funcionamento do termociclador, mistura incorreta dos reagentes da PCR, atividade inadequada da DNA polimerase, ou presença de substâncias inibidoras na matriz da amostra (HOORFAR et al., 2004; RADSTRÖM et al., 2003). Ao contrário, em uma PCR com a inclusão de um IAC, havendo DNA, o sinal de controle será produzido mesmo que a sequência alvo não esteja presente.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Coleta das amostras e isolamento das cepas de Bt**

As amostras de solo foram obtidas de diferentes áreas, todas localizadas na área experimental da Embrapa Milho e Sorgo, em Sete Lagoas (Figura 7, 8 e 9). Foram coletadas 5 amostras de cada região, que foram colocadas separadamente em sacos plásticos e devidamente identificadas.



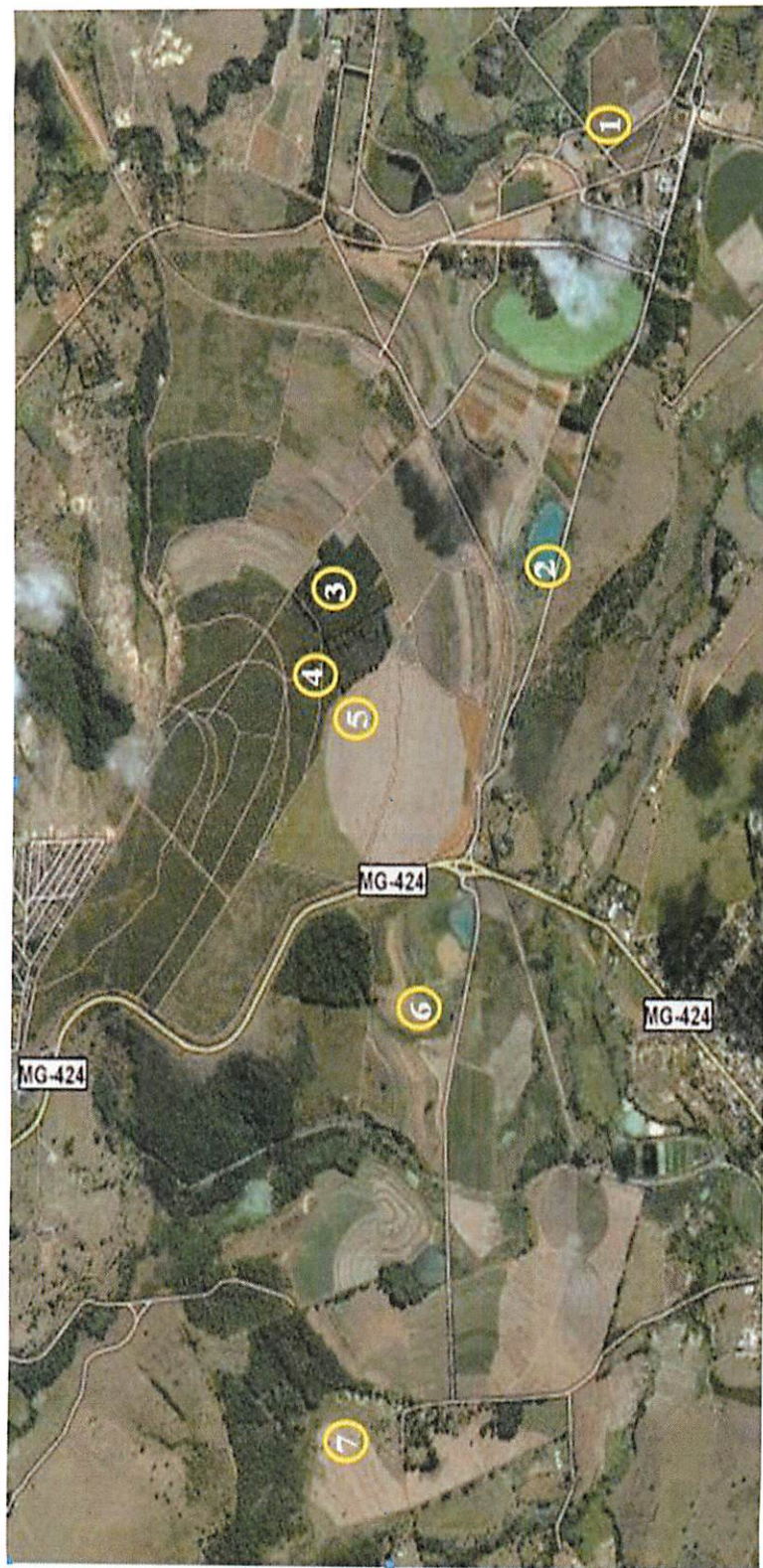


Figura 7. Mapa com área total da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas(MG). Os círculos amarelos são os pontos de coleta de solo para isolamento de possíveis *Bacillus thuringiensis*. 1. Várzea (VA); 2. Lagoa (L/A); 3. Mata de Pinheiros: coleta de solo e palha (P: SP, PP); 4. Cerrado (CE); 5. Pivô Central (PC); 6. Usina de Alcool desativada (UA); 7. Área Pecuária (PE).  
Fonte: Google Maps <<http://maps.google.com.br/>>



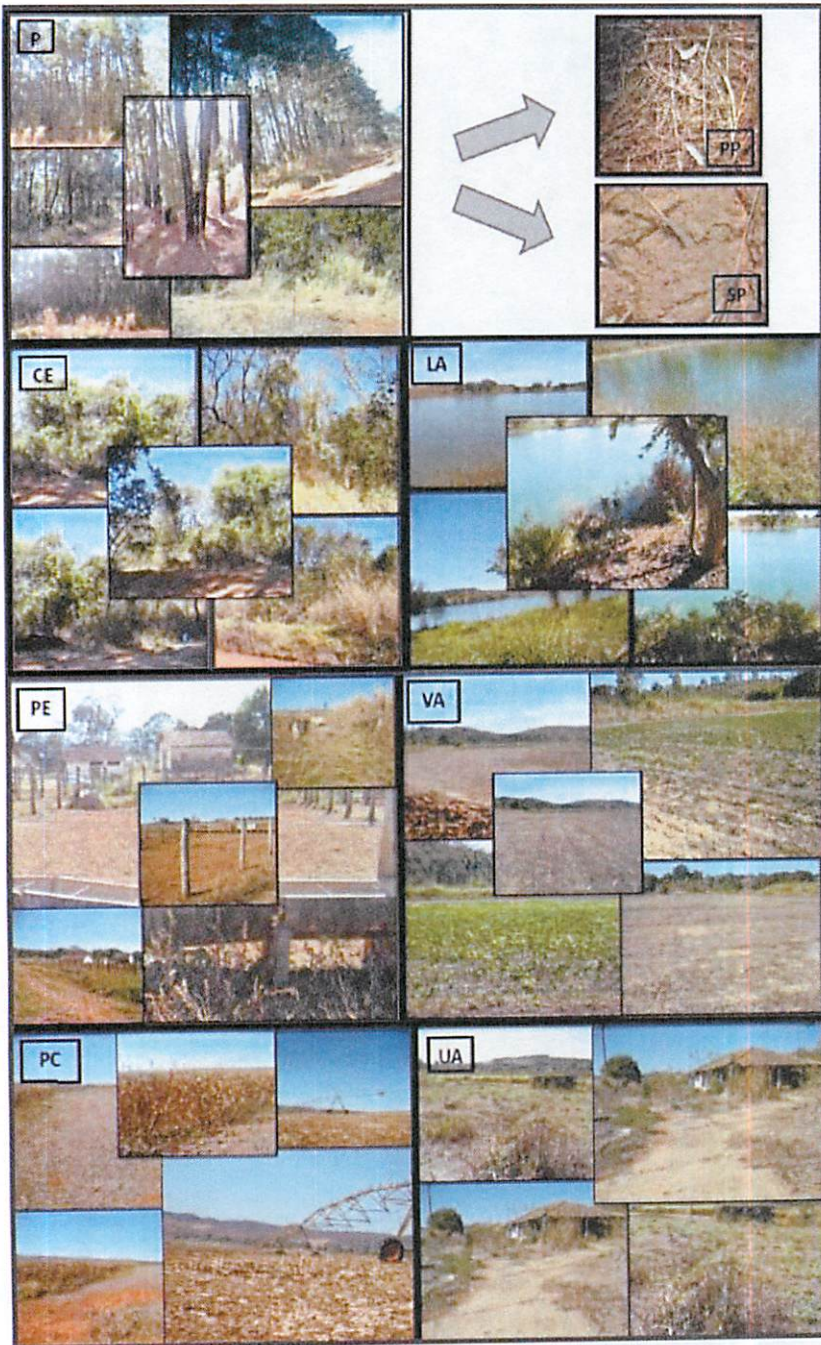


Figura 8 Áreas de coleta. P: Pinheiros (SP: solo e PP: palha); CE: Cerrado; LA: Lagoa; PE: Pecuária; VA: Várzea; PC: Pivô Central; UA: Usina de Álcool desativada.



Em laboratório, foram adicionadas 5,0 mL de solução salina 0,8% em 1g de amostra, sendo agitadas *over night*. Após a decantação do material, 1,0 mL da suspensão foi transferida para um microtubo, onde foi submetida ao choque térmico: 30 minutos a 65 °C seguido de 5 minutos no gelo. Foi coletado 50 µL da suspensão e espalhado em placas de Petri contendo meio de cultura Luria Bertani (LB) acrescida de ágar (Silva *et al.* 2002; Tabela 1; Figura 9). As placas de Petri foram vedadas com filme de PVC e incubadas a 30 °C por 24 horas.

Tabela 1 Meio LB

Meio LB	q.s.p. 1L
Glicose	1,0g
Caldo nutritivo	8,0g
Extrato de levedura	2,0g
MgSO <sub>4</sub>	0,3g
FeSO <sub>4</sub>	0,02g
ZnSO <sub>4</sub>	0,02g
MnSO <sub>4</sub>	0,02g

Fonte: Valicente e Barreto (2003).

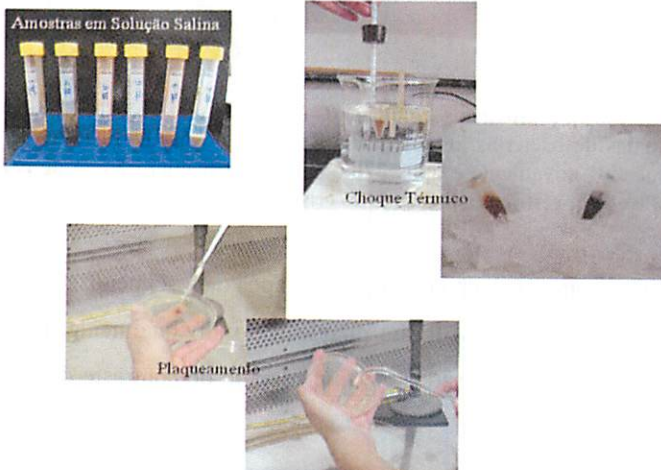


Figura 9. Preparo das amostras para identificação dos *Bacillus thuringiensis*. Após período determinado em solução salina, as amostras de solo passaram por choque térmico e foram plaqueadas e incubadas a 30°C por 24h.

As colônias que apresentaram características de *B. thuringiensis* foram selecionadas e plaqueadas individualmente, as placas foram vedadas e incubadas a 30 °C por 72 horas. Após esse período foram analisadas em microscópio de contraste de fase (Figura 10) e as cepas que apresentaram cristais foram selecionadas e seus *pellets* acondicionados em tubos e armazenados a -20 °C para posterior realização dos bioensaios.



Figura 10. Seleção de prováveis colônias *B. thuringiensis*. Após crescimento das colônias de bactérias, os prováveis Bt foram plaqueados individualmente, incubados novamente e após 72h analisados em microscópio de contraste de fase para verificar a presença do cristal.

Quanto à apresentação da Figura 10, após o crescimento das colônias de bactérias, os prováveis Bt foram plaqueados individualmente, incubados novamente e após 72h analisados em microscópio de contraste de fase para verificar a presença do cristal.

### 3.2 Diversidade Genética avaliada por rep-PCR

#### 3.2.1 Extração e purificação do DNA

O DNA das cepas de Bt foi extraído e purificado de acordo com Shuhaimi et al. (2001), com algumas modificações. As cepas foram plaqueadas em meio LB sólido e mantidas à temperatura de 30°C por aproximadamente 16 horas. Com o auxílio de uma alça, toda massa celular foi raspada e transferida para um microtubo e ressuspensionado em 700 µL de solução tampão (50 mM Glucose, 25 mM Tris/HCl e 10 mM EDTA, pH8) e lizosima na concentração de 20 mg/mL, sendo levado ao banho-maria a 37 °C por 30 min. Adicionaram-se 25 µL de SDS 10% e 5 µL de proteinase K (20 mg/mL) seguido de incubação à 60 °C por 1h.

Após esse período 500 µL de fenol/clorofórmio/octanol (25:24:1) foram adicionados seguido de centrifugação por 2 min a 12000 g. Do sobrenadante transferiu-se 300 µL para um novo tubo, acrescentou-se o mesmo volume de acetato de potássio 3M e 600 µL de álcool isopropanol, verteu-se suavemente e centrifugou-se a 12000 g por 10 min.

O sobrenadante foi cuidadosamente descartado, o pellet foi lavado com 300 µL de etanol 70% e novamente centrifugado a 12000 g por 5 min. Novamente descartou-se o sobrenadante e secou-se o pellet de forma que não ficasse resíduo de etanol e ressuspendeu-se em 150 µL de TE.

A qualidade do DNA foi observada através de corrida eletroforética em gel de agarose 1% e suas quantificações se deram através do aparelho Nanodrop (ND-1000 V3.1.2). Após esses processos as amostras de trabalho foram diluídas para a concentração de 10 ng/µL, a partir da solução concentrada. As amostras concentradas foram armazenadas a -20 °C e as amostras de trabalho a 4 °C.

### 3.2.2 PCR com os primers REP, ERIC e BOX

As seqüências dos *primers* utilizadas foram descritas por Versalovic et al. (1994) (Tabela 2).

Tabela 2 *Primers* utilizados para PCR e suas seqüências

Nome do <i>primer</i>	Seqüência 5' - 3'
BOX	CTACGGCAAGGCGACGCTGACG
REP1	IIICGICGICATCIGGC
REP2	ICGICTTATCIGGCCTAC
ERIC1	ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC
ERIC2	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG

As reações foram realizadas em tubos eppendorf 0,2 mL, devidamente identificados, com volume final de 20  $\mu$ L, sendo 30 ng de DNA, 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, tampão 10 X (20 mM de Tris e 50 mM de KCl), 250  $\mu$ M de dNTP, 10  $\mu$ M de cada primer e duas unidade de *Taq DNA Polimerase*. O Termociclador usado para a incubação das reações de PCR foi o modelo Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems).

As condições utilizadas para os primers BOX e ERIC foram: 95 °C por 1 min, seguido de 40 ciclos de 94 °C por 1 min, temperatura de anelamento de 50 °C por 1 min e 72 °C por 2 min. Após os ciclos, as reações foram submetidas a 72 °C por 7 minutos. Já para o par de primer REP as condições foram: 95 °C por 1 min, seguido de 41 ciclos de 94 °C por 1 min, temperatura de anelamento de 45 °C por 1 min e 72 °C por 2 min. Após os ciclos, as reações foram submetidas a 72 °C por 7 minutos.

Os fragmentos amplificados foram separados em gel de agarose 2% com duração da corrida de aproximadamente 3h a 100 V utilizando tampão TAE 1X (50X: 242 g TRIS base, 57,1 ml ácido acético glacial, 100 ml de solução de EDTA 0,5 M (pH 8.0), água destilada até 1 litro) para a preparação do gel quanto para cuba de corrida. Após a corrida o gel foi

corado em brometo de etídio (1µg/mL) durante 5 minutos e descorado em água por 15 minutos, sendo visualizado sob luz ultravioleta e as imagens captadas pelo fotodocumentador Kodak Gel Logic 200 Imaging System.

A reprodutibilidade das ampliações com os primers ERIC1, ERIC2, BOX1, REP1 e REP2 foi avaliada pela repetição da PCR para cada cepa.

### 3.2.3 Análise da dissimilaridade

Os fragmentos visualizados em géis de agarose, obtidas por marcadores dominantes binários (ERIC, REP e BOX), foram analisadas visualmente e construída uma matriz binária, considerando ausência (0) ou presença (1) de bandas. Utilizou-se o complemento do coeficiente de dissimilaridade de Jaccard (SJ) uma vez que esta medida de associação exclui a dupla-ausência (CRUZ; CARNEIRO, 2006):

$$SJ=1-(a/(a+b+c))$$

Onde:

a= presença de banda em ambos indivíduos (1 1)

b = presença de banda em um indivíduo e ausência no outro (1 0)

c = ausência de banda em um indivíduo e presença no outro (0 1)

A partir das estimativas de similaridades, as linhagens foram agrupadas utilizando o método hierárquico UPGMA (Unweighted Pair-Group Mean Average) com a realização do teste de bootstrap (1000 vezes) para avaliar a consistência do agrupamento (EFRON; TIBSHIRANI, 1993). Todas estas análises foram realizadas com o auxílio do programa Genes (CRUZ, 2001).

### 3.3 Caracterização molecular

Todas as cepas coletadas foram caracterizadas molecularmente quanto aos seus genes por PCR e PCR multiplex.

#### 3.3.1 Desenho e validação dos *primers*

*Primers* para genes *vip3* foram desenhados a partir de sequências (conservadas e/ou variáveis) depositadas no banco de dados de *B. thuringiensis* disponível na página <[http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil\\_Crickmore/Bt/index.html](http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/index.html)>.

Para tanto, foi utilizado o programa PRIMER 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>).

Antes da validação foram feitos testes de amplificação dos novos *primers* com cepas já conhecidas e com subespécies identificadas e disponíveis no banco de Bt da Embrapa Milho e Sorgo (Tabela 3). Nessas reações de PCR foram feitos um “pool” de DNA com todas essas cepas e testadas variações de temperaturas de anelamento, ou seja, gradiente de Tm.

Tabela 3 Cepas e suas supespécies utilizadas para identificação de fragmentos específicos para genes *vip3*

Nome	Supespécie	Nome	Supespécie
HD4	<i>Bt alesti</i>	T14	<i>Bt darmstadiensis</i>
348B	<i>Bt alesti</i>	T06	<i>Bt entomocidus</i>
T07	<i>Bt aizawai</i>	T24	<i>Bt neoleonensis</i>
HD11	<i>Bt aizawai</i>	T27	<i>Bt mexicanensis</i>
462A	<i>Bt galleriae</i>	T23	<i>Bt japonensis</i>
474	<i>Bt galleriae</i>	T16	<i>Bt indiana</i>
348L	<i>Bt galleriae</i>	HD73	<i>Bt kurstaki</i>
HD29	<i>Bt galleriae</i>	HD1	<i>Bt kurstaki</i>
344	<i>Bt tolworthi</i>	HD12	<i>Bt morrisoni</i>
T09	<i>Bt tolworthi</i>	HD7	<i>Bt dendrolimus</i>
426	<i>Bt tolworthi</i>	HD3	<i>Bt finitimus</i>
461A	<i>Bt tolworthi</i>	HD2	<i>Bt thuringiensis</i>
460	<i>Bt darmstadiensis</i>	T14	<i>Bt israelensis</i>

Tanto nas reações de “pool” quanto nas reações posteriores, onde foram destrinchadas as cepas que apresentaram apenas o tamanho do fragmento esperado, foram utilizadas nas reações de PCR dimetil sulfóxido (DMSO) 20% para diminuir possíveis fragmentos inespecíficos.

Para validação dos novos *primers* e confirmação da identidade dos fragmentos amplificados, estes foram removidos do gel e purificados com “QIAquick Gel Extraction Kit” (Qiagen, Valencia, CA), seguindo as recomendações do fabricante. As amostras foram então eluídas em 50  $\mu$ L de tampão EB (Qiagen, Valencia, CA), liofilizadas em centrífuga a vácuo e ressuspensas em água ultra-pura quando necessárias.

As reações de sequenciamento foram preparadas utilizando-se 90 ng do DNA purificado; 4  $\mu$ L de ET-Kit (DYEnamic™ ET terminator sequencing premix); 5  $\mu$ M do *primer*, em um volume final de 10  $\mu$ L. As reações foram submetidas a 95 °C por 10 segundos, 52 °C por 5 segundos, 60 °C por 2 minutos, repetidos por 35 vezes.

Antes da injeção no equipamento de sequenciamento Mega BACE 500 (Amersham) as reações foram submetidas a precipitação do DNA, ou método de “Clean Up”. Adicionou-se 1  $\mu$ L de acetato de amônio 7,5 M do kit de seqüenciamento e 30  $\mu$ L de etanol 95% gelado para cada produto da PCR e, protegida da luz, a placa foi mantida em temperatura ambiente por 15 minutos. A placa foi então centrifugada a 37000 rpm por 45 minutos e após esse período o sobrenadante foi descartado rapidamente. Adicionou-se 100  $\mu$ L de etanol 70% gelado e centrifugou a placa com a rotação anterior por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e a placa foi para estufa a 30 °C por 25 minutos. O pellet formado foi ressuspensionado em 10  $\mu$ L de solução de ressuspensão (kit do seqüenciamento) e a placa foi guardada no freezer -20 °C até a injeção no equipamento.

A qualidade das seqüências foi avaliada pelo programa Seqman 3.57 (DNASTar, Madison, WI) e as seqüências selecionadas foram comparadas com seqüências depositadas no GenBank por meio do algoritmo BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

### 3.3.2 Amplificação do DNA

Foram utilizados *primers* para os genes *cry*, *cyt* e *vip*, já descritos na literatura (CERÓN et al., 1994, 1995; VALICENTE et al., 2010; ESPINASSE et al., 2003; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ et al., 2009; IBARRA et al., 2003) e *primers* que ainda não foram publicados (Silva-Fagundes e Costa; Tabela 4).

Para as reações de amplificação foram utilizados microtubos de 0,2 mL, com um volume final de 20 µl sendo constituída de 30 ng de DNA purificado, 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, tampão 10 X (20 mM de Tris e 50 mM de KCl), 250 µM de dNTP, 20 µM de cada primer (40 µM primer vip2-reverse) e 2 unidades de *Taq DNA Polimerase*. As amplificações foram realizadas em termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems). Os produtos de amplificação foram separados em géis horizontais de agarose sendo as porcentagens variáveis de acordo com o tamanho do fragmento amplificado. Após a corrida o gel foi corado em brometo de etídio (1µg/mL) durante 5 minutos e descorado em água por 15 minutos, sendo visualizado sob luz ultravioleta e as imagens captadas pelo fotodocumentador Kodak Gel Logic 200 Imaging System.



Tabela 4 Primers usados para a caracterização molecular das cepas de *B. thuringiensis* (...continua...)

<i>primers</i>	Referência	Sequência (5' - 3')	pb	Tm (°C)	Controle
cry1Aa/cry1Ad	Céron et al., 1994	CJ1 TTATACTTGGTTCAGGCC CJ2 TTGGAGTCTCAAGGTGTAA	246	55	HD1
cry1Ab/cry1Ac	Céron et al., 1994	CJ4 AACAACTATCTGTTCTTGAC CJ5 CTCTTATTATACTTACACTAC	216	55	HD1
cry1Ac	Céron et al., 1994	CJ6 GTTAGATTAATAGTAGTGG CJ7 TGTAGCTGGTACTGTATTG	180	55	HD1
cry1B	Céron et al., 1994	CJ8 CTTCATCACGATGGAGTAA CJ9 CATAATTTGGTCGTTCTGTT	367	55	1644
cry1C	Céron et al., 1994	CJ10 AAAGATCTGGAACACCTTT CJ11 CAAACTCTAAATCCTTTCCAC	130	55	1644
cry1D	Céron et al., 1994	CJ12 CTGCAGCAAGCTATCCAA CJ13 ATTTGAATTGTCAAGGCCTG	290	55	1644
cry1Ea/cry1Eb	Céron et al., 1995	CJ14 GGAACCAAGACGAACTATTGC CJ15 GGTTGAATGAACCCTACTCCC	147	50	344
cry1Fa/cry1Fb	Céron et al., 1995	CJ16 TGAGGATTCTCCAGTTTCTGC CJ17 CGGTTACCAGCCGATTTCG	177	50	1657
cry1G	Céron et al., 1995	CJ18 ATATGGAGTGAATAGGGCG CJ19 TGAACGGCGATTACATGC	235	50	1657
cry1A5	Valicente et al., 2010	4100F-CGCCACAGGACCTTATC 4343R-TGCACAACCACCTGACCCA	231	55	1657
cry1Ab	Valicente et al., 2010	1320F-AATTTGCCATCCGCTGTA 1740R-TTGTGGTAGAAGCGTAGCGA	418	55	1657
cry1Fb	Valicente et al., 2010	1F-TGCGAATGAATTATGGGTC 390R-CACAAAGTGTAACCAATTTTAC	377	55	1657
cry1Fa1/cry1Fb	Valicente et al., 2010	321F-TAATAGGGCGGAATTTGGAG 561R-AAGCCCCAGTACATAATGAG	283	55	1657

Tabela 4 Continuação (...continua...)

<i>primers</i>	Referência	Sequência (5' - 3')	pb	T <sub>m</sub> (°C)	Controle
cry 9	Silva-Fagundes, dado não publicado				
cry 2Aa	Silva-Fagundes, dado não publicado				
cry 2Ab	Silva-Fagundes, dado não publicado				
cry 2Ac	Silva-Fagundes, dado não publicado				
cry 2Ad	Silva-Fagundes, dado não publicado				
cry 9Aa	Silva-Fagundes, dado não publicado				
cry 11	Silva-Fagundes, dado não publicado				
cyt1	Ibarra et al., 2003	F-CCTCAATCAACAGCAAGGG TTATT R-TGCAAACAGGACATTGTAT GTGTAATT	480	58	T14
cyt2	Ibarra et al., 2003	F-ATTACAAATTGCAAATGGTA TTCC R-TTTC AACATCCACAGTAATT TCAAATGC	356	56	T14
cyt2B	Costa, dado não publicado				
cyt2Ba	Costa, dado não publicado				
cyt1Ab	Costa, dado não publicado				
cyt1Aa	Costa, dado não publicado				

Tabela 4 Continuação

<i>primers</i>	Referência	Sequência (5' - 3')	pb	T <sub>m</sub> (°C)	Controle
vip3'	Espinasse et al., 2009	F-ACATCCTCCCTACACTTTCTAATAC R-TCTTCTAATGGACCCGTTCTCTAC	678	53	HD125
vip2	Hernández-Rodríguez et al., 2009	F-GATAAAGAAAAAGCAAAAGAAT GGGRNAARRA R-CCACACCATCTATATACAGTA ATATTTTCTGGDATNGG	845	50	1657
vip3	Hernández-Rodríguez et al., 2009	F-TGCCACTGGTATCAARGA R-TCCTCCTGTATGATCTACATA TGCATTYTRTRTT	1621	47	1657

\*Código universal para bases degeneradas: R=A, G; Y=C, T; M=A, C; S=G, C; H=A, T, C; D=G, A, T; N=A, C, G, T

OBS: Com as referências bibliográficas, sequências 5'-3', tamanho do fragmento amplificados (em pares de bases (pb)), temperatura de anelamento (T<sub>m</sub>) e cepa utilizada para controle positivo.

Para eliminar resultados falso-positivos, utilizou-se primer para amplificação do gene 16S RNA ribossomal, sendo esta subunidade encontrada no RNA ribossomal de procariontes. Os *primers* usados foram os descritos por Nubel et al. (1996) e Lane (1991) e estão listados na Tabela 5.

Tabela 5 *Primers* utilizados para as reações de PCR multiplex

<i>Primer</i>	Sequência 5'-3'
968F	CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGCGGGG GCACGGGGGGGAACGCCAAGAACCTTAC
1494R	TGACTGACTGAGGYTACCTTGTTACGACTT

\*Código universal para bases degeneradas: R=A, G; Y=C, T; M=A, C; S=G, C; H=A, T, C; D=G, A, T; N=A, C, G, T

### 3.4 Bioensaio de mortalidade para *Spodoptera frugiperda*

Foram usadas as 62 cepas de *Bacillus thuringiensis* em bioensaios de mortalidade para a lagarta do cartucho, *S. frugiperda*, uma testemunha (substituição da suspensão bacteriana por água destilada) e um controle positivo, 344 *B. thuringiensis tolworthi* (VALICENTE; LANA, 2008). Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado com 4 repetições por cepa de Bt e 12 unidades experimentais por repetição. O mesmo procedimento, com o dobro de repetições, foi realizado para a testemunha e o controle positivo.

Copos plásticos de 50 mL contendo pedaços de dieta artificial com aproximadamente 3,3 cm<sup>3</sup>, à base de feijão, germe de trigo e farelo de soja (GREENE; LEPPLA; DICKERSON, 1976), foram banhados com 150 µL de suspensão, contendo esporos e cristais das cepas e uma gota de Tween 20 (Monolaurato de Sorbitan Etoxilado 20 EO) para melhor dispersão e fixação da suspensão na dieta devido o poder emulsificante do produto. Após a evaporação do excesso de umidade, 48 lagartas do segundo instar larval foram acondicionadas individualmente, perfazendo desta forma 48 repetições por tratamento (cepa). O mesmo procedimento, com o dobro de

repetições, foi realizado para a testemunha, substituindo a suspensão bacteriana por água destilada sobre a dieta, e para o controle positivo, realizado com a cepa Bt344.

Após a evaporação do excesso de solução na dieta dos tratamentos, lagartas de segundo instar larval foram individualizadas nos copos. Os copos foram colocados em suportes de isopor e acondicionados em sala climatizada ( $26 \pm 1^\circ \text{C}$ ,  $70 \pm 10\%$  de UR e fotofase de 12h). A avaliação de mortalidade foi feita após 1 semana.

As médias e erros-padrão da mortalidade foram calculadas para cada tratamento. Os dados foram testados quanto à normalidade dos erros e homogeneidade de variância utilizando os procedimentos UNIVARIATE e GLM, respectivamente (SAS INSTITUTE, 2002). Como os dados não atenderam a primeira pressuposição pelo teste de Shapiro-Wilk a  $p \leq 0,05$ , as médias dos tratamentos foram submetidas à anova de Friedman pelo procedimento RANK e ANOVA (SAS INSTITUTE, 2002). As médias foram comparadas duas a duas pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% de significância pelo procedimento NPAIRWAY (SAS INSTITUTE, 2002).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Coleta das amostras e isolamento das cepas de Bt

Das 40 amostras coletadas, 178 colônias foram selecionadas como possíveis cepas de *Bacillus thuringiensis* e após análise em microscópio de contraste de fase foi possível confirmar que 62 (35%) dos 178 isolados apresentaram cristais.

Ramalakshmi e Udayasuriyan (2010) coletaram 525 amostras de solo em 14 regiões da Índia (Western Ghats) e 56% das amostras deram resultado positivo para Bt e uma frequência moderada de Bt em amostras de solo de floresta da região, sugerindo esse resultado à grande quantidade de nutrientes no solo em si. Martin e Travers (1989) e Wang et al. (2003) relataram porcentagens de isolados de Bt coletados em diferentes amostras de solo variando entre 3 a 85% , corroborando com os resultados obtidos.

Das 62 cepas encontradas, 42 foram isoladas de amostras de palha da área de pinheiros; 13 de amostras de área do pivô central; 2 da lagoa; 2 da várzea; 2 da usina de álcool desativada e apenas 1 do solo da área de pinheiros. Não foram isoladas cepas de Bt em áreas de cerrado e em lavouras para pecuária (Tabela 6).

Valicente e Barreto (2003) coletaram amostras de solo de 10 estados do Brasil (1448 amostras totais) em 4 diferentes regiões geográficas. Em todas as regiões amostradas foram isolados de *B. thuringiensis*, sendo 15,25% das cepas do Nordeste, 39,78% do Sul, 0,81% do Sudeste e 44,16% da região Centro-Oeste.

Yu et al. (2011) caracterizando cepas de *B. thuringiensis* em diferentes áreas da China, encontrou as maiores porcentagens dessa bactéria em regiões de floresta, indicando ser estes os melhores ambientes de crescimento dessa bactéria.

Tabela 6 Número de cepas de *B.thuringiensis* por áreas de coleta

Áreas de coleta	Nº amostras	Quantidade Bt	Total %
Pinheiro-Palha	5	42	67,74
Pivô	5	13	20,96
Lagoa	5	2	3,22
Várzea	5	2	3,22
Usina Desativada	5	2	3,22
Pinheiro-Solo	5	1	1,61
Cerrado	5	0	0
Lavoura/Pecuária	5	0	0

Martin e Travers (1989) concluíram que a presença de insetos não prevê a presença de *B. thuringiensis* em uma amostra de solo particular e que *B. thuringiensis* possui distribuição ubíqua no solo agrícola de Bangladesh, não encontrando nenhuma correlação entre os ambientes de insetos e densidades de *B. thuringiensis*. Uma correlação simples e análise de regressão mostrou que a porcentagem de areia e os níveis de cobre disponível no solo tiveram importantes contribuições positivas e negativas, respectivamente, para a abundância e distribuição de *B. thuringiensis* nas terras agrícolas (HOSSAIN; AHMED; HOQUE, 1997). Pesquisas em diferentes regiões geográficas têm mostrado que *B. thuringiensis* é onipresente em solos naturais, bem como em ambientes de criação de insetos (DeLUCCA; SIMONSON; LARSON, 1981; HASTOWO; LAY; OHBA, 1992; OHBA; AIZAWA, 1986; PÁDUA et al., 1992).

A relação entre diferentes regiões de coleta e a maior incidência de *B. thuringiensis* não é bem conhecida. A grande frequência de Bt encontrados na palha da área de pinheiros, área esta sem ação do homem, pode estar relacionada com o acúmulo de matéria orgânica ao longo dos anos e na área de cultivo de culturas (pivô) pelo tratamento do solo como adubação e a rotação de cultura. Já as áreas sem frequência de Bt, cerrado e lavoura/pecuária, podem estar relacionados com solos pobres e não propensos ao crescimento de *B. thuringiensis*. Uma possível causa do não isolamento de Bt na área de lavoura/pecuária seja a presença de outras

bactérias que apresentaram com coloração diferente das esperadas (Figura 11).

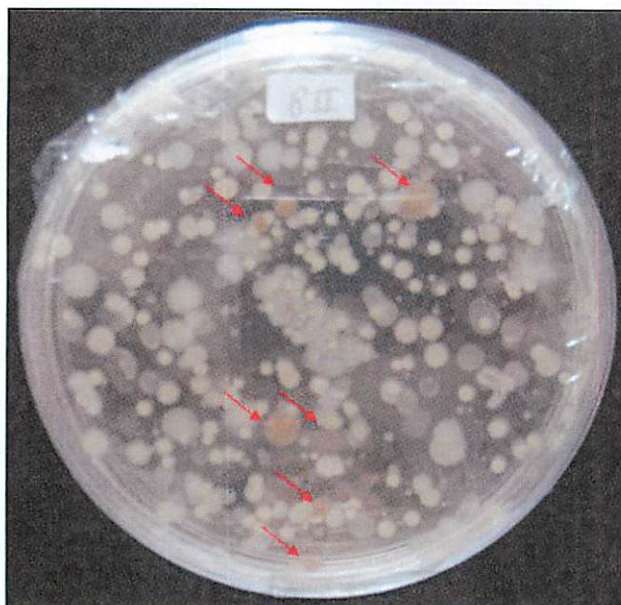


Figura 11. Colônias de bactérias do solo da área de lavoura/pecuária após choque térmico e incubação por 24h a 30°C. →: colônia de bactéria com coloração marrom, diferente da coloração esbranquiçada de Bt.

Nas amostras coletadas foi possível observar 64,5% dos cristais em formato esférico, 29% em formato esférico e cubóide e 6,5% em formato bipiramidal. Nas cepas isoladas da palha da área de pinheiro, 57% dos cristais observados apresentaram formato esférico e 43% formato esférico e cubóide. As cepas da área de pivô apresentaram 77% das cepas com cristais esféricos e 23% com cristais bipiramidais. Das cepas isoladas da área da lagoa, 50% apresentaram cristais esféricos e 50% bipiramidais. As regiões de várzea, solo da área de pinheiros e da usina de álcool desativada foram encontradas apenas formatos de cristais esféricos (Figura 12). Essa variedade de formatos de cristais sugere uma diversidade dos isolados de Bt encontrados nas diferentes regiões de coleta (RAMALAKSHMI; UDAYASURIYAN, 2010).



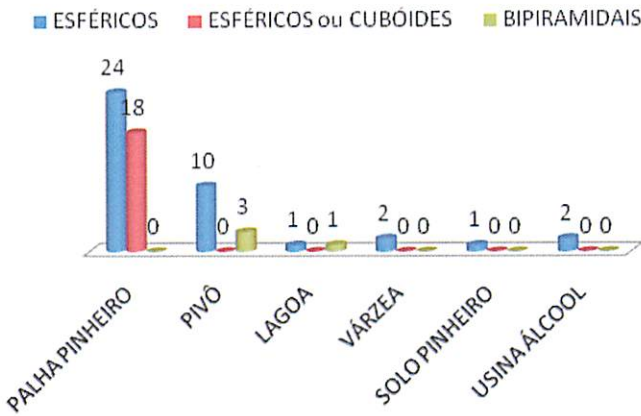


Figura 12. Formato dos cristais das cepas de *Bacillus thuringiensis* e suas regiões de isolamento.

A identificação inicial de Bt é principalmente baseada na presença de inclusões cristalinas. Com base no número e forma das inclusões cristalinas, Ramalakshmi e Udayasuriyan (2010) caracterizaram 316 cepas de Bt da Índia e as dividiram em sete grupos: bipiramidal, cubóide, cubóide e piramidal, retangular, esférica, esférica pequena, e cristais anexado ao esporo. A maior parte das cepas, 27% e 21%, apresentaram respectivamente formato de cristais cubóides e bipiramidais. Outros trabalhos relatam cristais bipiramidais como predominância de 46% das amostras de Bt (BERNHARD et al., 1997; MARTIN; TRAVERS, 1989). Lee (1995) analisou 113 cepas de *B. thuringiensis* e encontrou grande variedade de morfologia dos cristais. Observou-se corpos paraesporais bipiramidais, amorfos, esféricos, cubóides e retangulares.

## 4.2 Diversidade Genética avaliada por rep-PCR

### 4.2.2 PCR com os primers REP, ERIC e BOX

O *primer* único BOX e o par de *primer* REP foram responsáveis pela maior parte das informações resultantes, ou seja, cada um deles amplificou 15 fragmentos de tamanho diferentes enquanto o par de *primer* ERIC amplificou 11 fragmentos distintos e os resultados de todos os *primers* utilizados geraram fragmentos entre 220 a 3054 pb (Figura 13).

Colaborando com nossos resultados, Lin et al. (2008) analisaram 20 isolados clínicos de *S. maltophilia* e observaram um número menor de fragmentos no perfil de ERIC-PCR (13) e uma mesma quantidade de fragmentos de REP-PCR e BOX-PCR (17).

Analisando o perfil genético em géis de agarose observaram-se em ERIC-PCR poucas bandas maiores, bandas principais de tamanhos intermediários e uma maior quantidade de pequenas bandas, REP-PCR com duas faixas de bandas principais de tamanhos maiores e BOX-PCR com bandas de tamanho intermediárias e predominância de manchas, rastros. Diferentemente Lin et al. (2008) encontraram algumas manchas em ERIC-PCR, sendo BOX-PCR geralmente composto por uma banda grande e poucas bandas menores e de 3 a 9 bandas perceptíveis observadas na maioria das impressões digitais de REP-PCR.

Pode-se observar um padrão uniforme de bandas em todas as cepas coletadas na palha do pinheiro e um padrão uniforme nas cepas coletadas no pivô central. Esse padrão foi permitido por ERIC, REP e BOX-PCR, sendo considerado todos eles satisfatórios para a discriminação de cepas de *B. thuringiensis*. Zara et al. (2006), por sua vez, utilizou BOX-PCR e ERIC2-PCR, além do método de RAPD, para diferenciar cepas de *Bacillus thuringiensis*. A análise das impressões digitais por PCR mostrou um total de 17 bandas de DNA com peso molecular diferentes usando BOXA1R e 33 com ERIC2. O trabalho concluiu que ERIC-PCR permitiu a diferenciação de

todos os seis estirpes de referência *B. thuringiensis* , diferentemente do permitido por BOX-PCR.

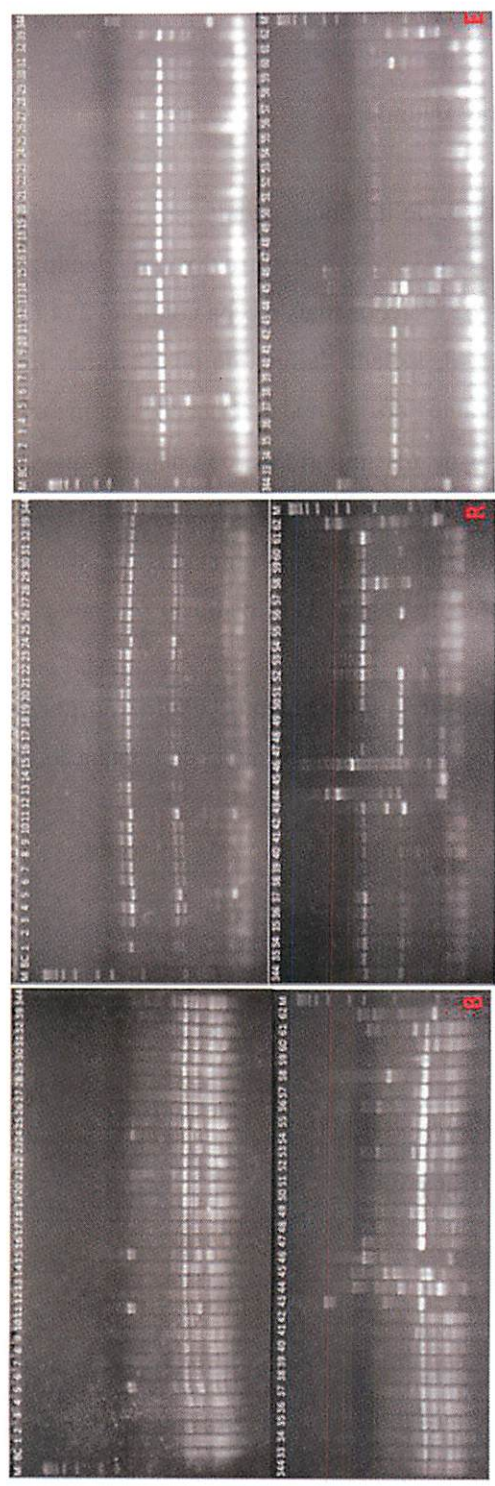


Figura 13. Gel de agarose 2% resultante do rep-PCR. B: BOX-PCR; R: REP-PCR; E:ERIC-PCR; M: marcador de peso molecular de 1Kb; BC: branco; 344: cepa controle; 1-42: cepas isoladas da palha da área de pinheiros; 43-55: cepas isoladas da área de pivô central; 56-57: cepas isoladas da região da lagoa; 58-59: cepas isoladas da região de várzea; 60: cepa isolada do solo da área de pinheiros; 60-61: cepas isoladas da usina de álcool desativada.

### 4.2.3 Análise da dissimilaridade

A partir da matriz de distância gerada pelos dados fornecidos com os *primers* ERIC, REP e BOX foi construído um dendrograma único de dissimilaridade com os 62 isolados mais a cepa controle, 344 (Figura 14). Pode-se observar que a cepa 43, isolada da área de pivô central, foi a mais distante geneticamente do restante dos grupos formados, com uma distância de aproximadamente 100% de dissimilaridade das demais, que se agruparam em um grande grupo constituído de subgrupos. A cepa 43PP é uma das cepas que não apresentaram amplificações dos genes utilizados para caracterização (Figura 19) e apresentou padrões de bandas bem distintas das outras cepas analisadas (Figura 13).

Após análise utilizando agrupamento UPGMA, o ponto de corte (43%) foi definido, considerando a média da distância da população, e 4 grupos foram distintamente definidos (Figura 15).

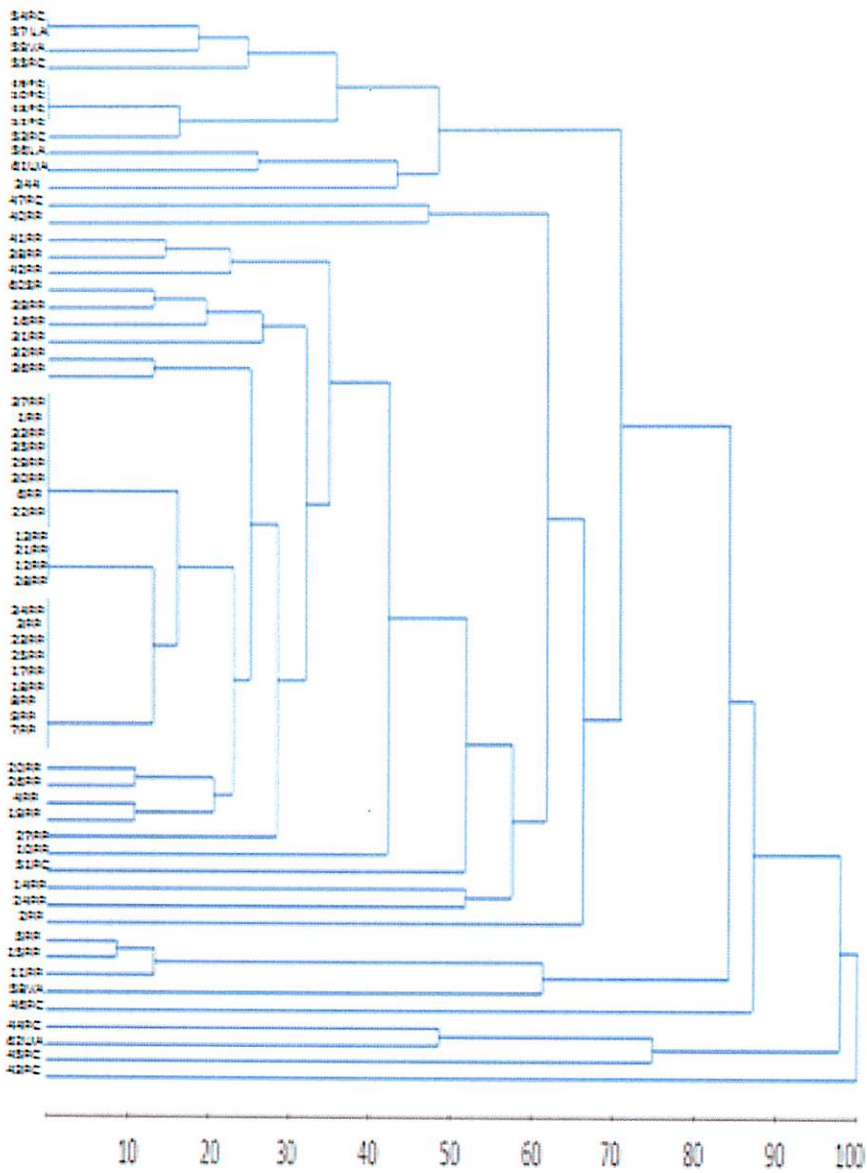


Figura 14. Dendrograma construído com base na matriz de dissimilaridade pelo Coeficiente de Jaccard, usando o método das médias das distâncias (UPGMA). 1-62: Cepas de Bt; Bt344: cepa controle. PP: palha do pinheiro; SP: solo do pinheiro; VA: várzea; UA: usina de álcool desativada; PC: pivô central; LA: lagoa

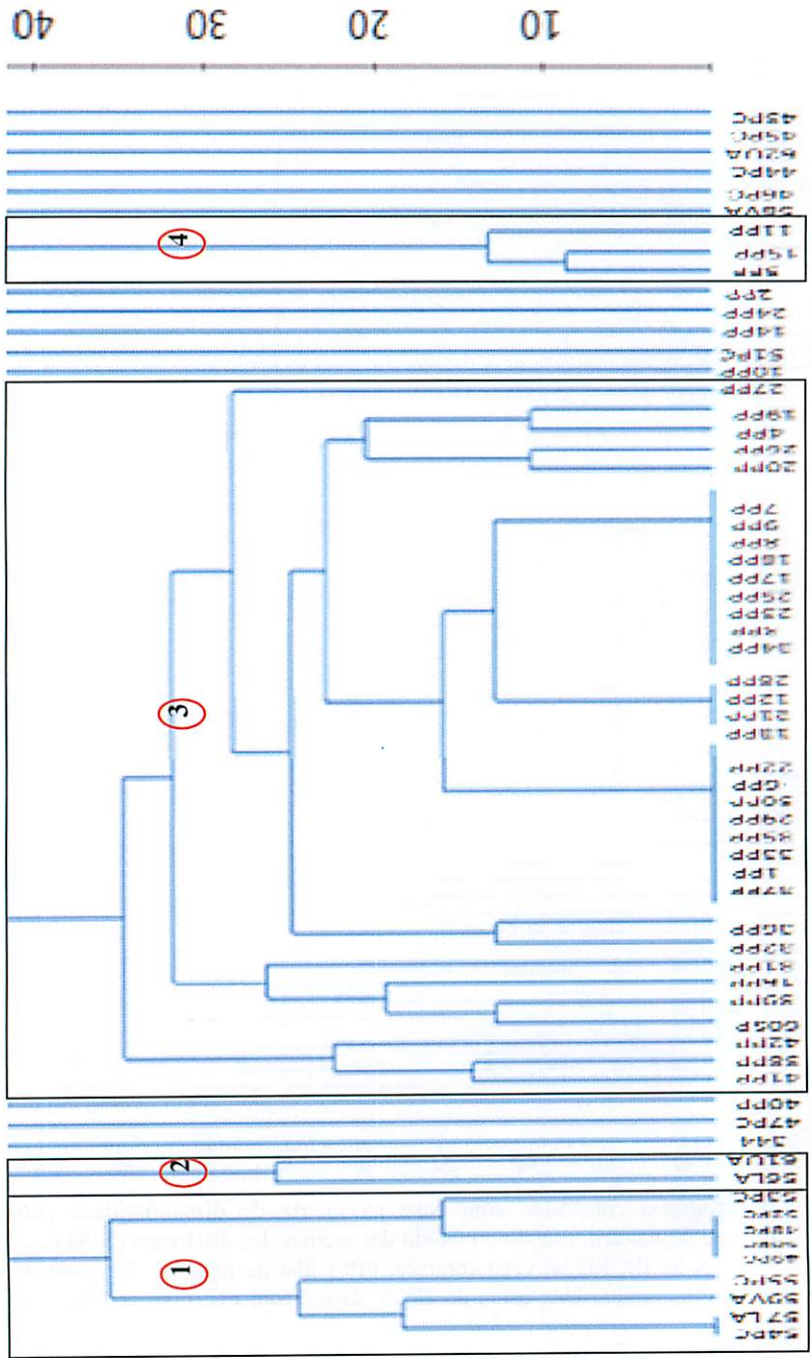


Figura 15 Divisão do dendrograma (com ponto de corte de 43%) em 4 grupos numerados de e circulados



O grupo 1 é composto de 9 cepas provenientes, predominantemente, da área de pivô central (78%) e uma menor contribuição das áreas da lagoa (11%) e várzea (11%). As cepas 54PC e 57LA são muito similares tendo praticamente 0% de dissimilaridade, assim como as cepas 49PC, 50PC, 48PC e 52PC. Apesar da similaridade as cepas apresentam perfis gênicos diferentes. Algumas das cepas desse grupo não possuem nenhum dos genes analisados enquanto outras apresentam *cyt2Ba*, *cry9*, *cry1Ab/cry1Ac* e *cry2Ab*. Apesar de não haver relação direta com os genes, foi observada uma relação com o formato dos cristais, pois todos os cristais bipiramidais encontrados nas cepas isoladas se enquadraram nesse grupo.

O grupo 2 é um pequeno grupo composto apenas pelas cepas 56, proveniente da área da lagoa, e 61, proveniente da área da usina de álcool desativada. As cepas estão distantes entre si por menos de 30%, ou seja, são mais de 70% similares, mas apresentam caracterização gênica diferentes tendo a 56LA os genes *cry1Aa/cry1Ad* e a 61UA o gene *cry1Ab/cry1Ac*. Ambas as cepas possuem cristais de formato esférico e estão na faixa de 12 a 22% de mortalidade de *Spodoptera frugiperda*.

O grupo 3 é o maior grupo, contendo 34 cepas isoladas da palha da área de pinheiros e apenas 1 isolada da mesma área, mas de amostras de solo. Todas as cepas coletadas que possuem cristais esféricos e cubóides se agruparam nesse conjunto de cepas. Das cepas do grupo, 60% se reagrupam em 3 subgrupos. Dentro desses subgrupos, 100% de similaridade entre as cepas são observados e entre os subgrupos a similaridade é de 80%, podendo considerar todas muito similares entre si.

O grupo 4, também formado por cepas isoladas da palha dos pinheiros, possuem apenas 3 cepas: 5PP, 15PP e 11PP. Diferentemente do que se observou nos grupos anteriores, o gene *vip3Aa* foi encontrado em todas as bactérias do grupo. Além do gene *vip3Aa*, a cepa 5PP também possui os genes



*cry1Ab/cry1Ac* e *cry2Aa*. Os cristais das 3 cepas são esféricos e todas apresentaram taxa de mortalidade insignificante para *S. frugiperda*.

Algumas cepas não se agruparam com nenhuma outra. Entre elas estão: a cepa controle Bt344, cepas isoladas de áreas da palha de pinheiros, pivô central, várzea e usina de álcool desativada. As distâncias entre essas cepas foram variadas. A cepa Bt344 apresentou similaridade de 50% com o grupo 2, grupo este composto por cepas com as maiores taxas de mortalidade observadas.

Os dados analisados inferem uma relação entre a similaridade de cepas de *B. thuringiensis* e seus locais de origem. Apesar das cepas analisadas não apresentarem taxas significativas de mortalidade para *S. frugiperda*, observou-se uma tendência ao agrupamento de cepas com mesmo padrão de mortalidade. Já com relação à constituição gênica das cepas, não foram observadas relação direta, mas indireta quando levamos em conta a formação do cristal, que foi bem relacionado com os grupos de similaridade formados. Silva (2009) utilizando alguns *primers* de rep-PCR para caracterizar cepas de *B. thuringiensis* também encontrou similaridade entre cepas provenientes de uma mesma região e com mesmas taxas de mortalidade para *S. frugiperda* mas não encontrou relação entre a diversidade de Bt e seus genes. Ramirez e Ibarra (2005) sugerem que a relação genética entre cepas de Bt não é necessariamente definida apenas pela especificidade tóxica, mas por uma série de atributos, tais como genes *cry*, morfologia do cristal, padrão plasmidial e local de origem. Lima et al. (2002) relataram nenhuma relação entre as seqüências ERIC e REP com os tipos de endotoxinas produzidas por *B. thuringiensis*.

Os resultados obtidos reforçam os relatos sobre a relação da evolução de *B. thuringiensis* com a localização geográfica das cepas, conforme já demonstrado em estudos anteriores (HONGYU; ZINIU; WANGXI, 2000; SILVA, 2009; RAMIREZ; IBARRA, 2005; LIMA et al., 2002).

### 4.3 Caracterização molecular

#### 4.3.1 Validação dos *primers*

Foram desenhados e testados 11 pares de *primers* para ampliações de regiões gênicas de *vip3Aa*, *Ab2*, *Ad2*, *Ae1*, *Afl*, *Ah1*, *B* e *Ba1*. Um primeiro foi realizado usando o “pool” de DNA de cepas de *B. thuringiensis* com identificação de subespécies (Tabela 3), 7 dos *primers* amplificaram fragmentos com tamanho esperado e obtiveram suas temperatura de anelamento otimizadas(Tabela 7). Na Figura 16 podem ser observadas as ampliações de tamanhos esperados (*Vip3Afl* e *Vip3Ah1*) e ampliações com tamanhos inespecíficos (*Vip3B*) juntamente com o gradiente de temperatura de anelamento.

Tabela 7 *Primers* desenhados para o gene *vip3* com suas sequências no sentido 5'-3', o tamanho dos fragmentos esperados e a temperatura de anelamento em °C

<i>Primers</i>	Sequência (5' - 3')	pb	Tm (°C)
<i>Vip3Aa</i>	F- TAAATCGCGACTGCCTCTCT R- AAAGCGAGAACAACCAATCG	164	62
<i>Vip3Aa'</i>	F- CTTCCTCAAGGAGCGTGAAG R- AAAGCGAGAACAACCAATCG	235	68
<i>Vip3Ba1</i>	F- AAACGGATACAGGTGGTGGT R- GATTTTGCTCATTGGCGATT	180	60
<i>Vip3Ab2</i>	F- AGGGAGCATTGGAGGAAAC R- ACCTTGCCAAATCCATTAC	232	60
<i>Vip3Ae1</i>	F- TGGAACCTTTCGACAAAACC R- TCCGCGAGAAAGCTCTACAT	223	60
<i>Vip3Afl</i>	F- AAGGGCCCTACCGAGTTTTA R- AAGCTCCCATTTACCCATC	189	60
<i>Vip3Ah1</i>	F- AGGATGGCTCTCCTGCAGAT R- AACATTTCCGACCTCACTGC	220	62

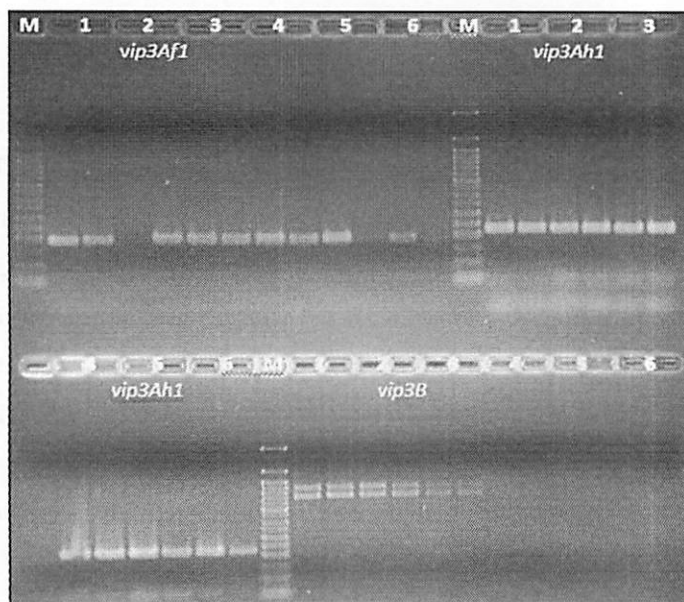


Figura 16 Gel de agarose 2%. Produto de reações de PCR, em duplicata, de *primers* desenhados para genes *vip3*, “pool” de DNA e gradiente de temperatura de anelamento ( $T_m$ ). M: marcador de peso molecular de 50pb; 1-6: variações de  $T_m$  de 4 °C em 4 °C sendo 1: 48 °C; 2: 52 °C e assim sucessivamente. Genes *vip3Af1*, *Ah1* com ampliações de tamanhos esperados (189 e 220pb, respectivamente) e *vip3B* com ampliações não esperadas ou inespecíficas

Após as reações de “pool” de DNA, os *primers* que apresentaram bandas específicas foram analisados cepa a cepa, resultando na escolha de cepas positivas para tais genes, como pode ser observado na Figura 17 com as ampliações do *primer* Vip3Ba1 onde as cepa 461A, HD1 e HD125 foram consideradas cepas controle positivo.

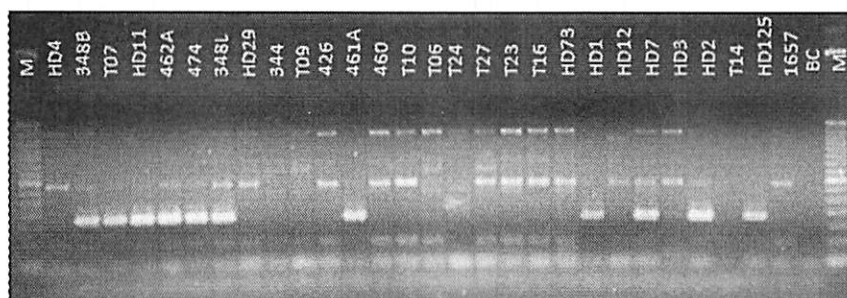


Figura 17 Gel de agarose 2%. Amplificações com o *primer* Vip3Ba1. M: marcador de peso molecular de 50pb; BC: branco; 461A, HD1 e HD125: cepas controle positivo

Após sequenciamento das bandas amplificadas de uma cepa controle positivo escolhida de cada *primer*, foram feitas as análises de bioinformática, sendo todos os valores de e-value baixos o suficiente para que os resultados obtidos tenham confiabilidade (COSTA, 2011) ; Tabela 8).

A identidade de 98% e cobertura de 71%, pode indicar a especificidade da amplificação do *primer* Vip3Aa, de 164 pb. Além desse, uma identidade de 87% e 98% de cobertura, também indicam a especificidade do *primer* Vip3Ah1.

Já os *primers* Vip3Ba1 e Vip3Af1, após análises de bioinformática, obtiveram identidade com o gene *vip3Aa*, e os *primers* Vip3Ab2 e Vip3Ae1 com o gene *vip3D* (Tabela 7).

O *primer* Vip3Aa' com amplificação de 235 pb, obteve identidade de 72% em 77% de cobertura com genes de *Bacillus cereus*. Esses resultados podem ser associados a estudos anteriores que concluíram que a distinção entre estas duas espécies não é clara e continua sendo assunto de interesse de muitos taxonomistas (GLARE; O'CALLAGHAM, 2000; HANSEN; SALAMITOU, 2000; SCHNEPF et al., 1998), uma vez que a cepa utilizada para tal

amplificação é 461A *Bacillus thuringiensis tolworthi*, do banco de Microrganismos do Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo da Embrapa.

Tabela 8 Análise do Blast realizado com os iniciadores desenhados nesse estudo<sup>1</sup>

Sequências dos primers	Tamanho do fragmento (pb)	Grupo alvo	Sequência mais similar	Acesso	Identidade (%)	Cobertura (%)	E-value
F- TAAATCGCGACTGCCTCTCT R- AAAGCGAGAACAACCAATCG	164	<i>vip3Aa</i>	<i>B. thuringiensis vip3Aa</i>	L48811.1	98	71	1e-76
F- CTTCTCAAGGAGCGTGAAG R- AAAGCGAGAACAACCAATCG	235	<i>vip3Aa</i>	<i>B. cereus</i>	CP001186.1	72	77	1e-37
F- AAACGGATACAGGTGGTGGT R- GATTTTGCTCATTGGCGATT	180	<i>vip3Bal</i>	<i>B. thuringiensis vip3Aa</i>	FJ626677.1	88	98	1e-35
F- AGGAGCATTTGGAGGAAAC R- ACCTTGCCAAATCCATTCAC	232	<i>vip3Ab2</i>	<i>B. thuringiensis vip3D</i>	DQ054848.1	77	91	1e-51
F- TGGAACCTTTCGACAAAACC R- TCCGCGAGAAAGCTCTACAT	223	<i>vip3Ae1</i>	<i>B. thuringiensis vip3D</i>	DQ054848.1	93	99	1e-82
F- AAGGGCCCTACCGAGTTTTA R- AAGCTCCCATTTACCCCATC	189	<i>vip3Afl</i>	<i>B. thuringiensis vip3Aa</i>	AF399673	99	99	2e-85
F- AGGATGGCTCTCCTGCAGAT R- AACATTTCCGACCTCACTGC	220	<i>vip3Ahl</i>	<i>B. thuringiensis vip3Ahl</i>	EU287924.8	87	98	3e-58

1. Disponível em <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast> no dia 13/07/2011.

### 4.3.2 Amplificação do DNA

Para melhor análise, os resultados foram divididos em classes gênicas: *cry*, *cyt* e *vip*.

De todas as cepas analisadas para os genes *cry*, o gene *cry1Ab*, resultante da amplificação de *cry1A5*, foi o mais frequente (encontrado em 39 cepas), seguido de *cry9* (27 cepas), *cry1A(b)/cry1A(c)* (10 cepas), *cry 2Aa* (9 cepas), *cry1A(a)/cry1A(d)* (3 cepas), *cry 2Ab* (2 cepas), *cry1A(c)* e *cry1B* (1 cepa cada). Os genes *cry1Ab cry1C cry1D cry1Ea/Eb cry1Fa/Fb cry1Fal/Fb cry1Fb cry1G cry1I cry2Ac cry2Ad cry9Aa* não foram encontrados nas cepas isoladas (Tabela 9).

Os genes *cry2* também foram encontrados no trabalho de Medeiros et al. (2005), que verificaram a presença desse gene em todas as cepas testadas com 100% de mortalidade para *Plutella xylostella* e no padrão HD-1. Os resultados obtidos são interessantes, uma vez que a presença desse gene codifica proteínas tóxicas para insetos da ordem Lepidoptera e Diptera (CÁRDENAS et al., 2001; MONNERAT et al., 1999).

Os genes *cry9* foram encontrados em 47,82% das cepas caracterizadas por Pinto e Fiúza (2003), mas Medeiros et al. (2005) e Bravo et al. (1998) não encontraram genes *cry9* nas cepas analisadas. Os autores do primeiro trabalho sugerem que as variações da frequência gênica de cepas de *B. thuringiensis* podem ser causadas por fatores abióticos, como fatores físico-químicos do solo.

Os resultados encontrados sobre a alta frequência dos genes *cry1* corroboram com outros trabalhos de caracterização desses mesmos genes em diferentes coleções de Bt (BRAVO et al., 1998; FATORETTO et al., 2007). Outro trabalho também relata a grande abundância desses genes *cry1* em grande variedade de representantes na natureza (VILAS-BÔAS, 2002). Diferentemente

Valicente et al. (2010) encontrou uma maior frequência de genes *cry1D* na sua coleção de cepas.

Tabela 9 Número de cepas amplificadas para genes *cry*

<i>Primers</i>	Referencial	Genes Amplificados	Nº de cepas
<i>cry1A5</i>	Valicente et al., 2010	<i>cry1Ab</i>	39
<i>cry1Aa/cry1Ad</i>	Céron et al., 1994	<i>cry1A(a)/cry1A(d)</i>	3
<i>cry1Ab/cry1Ac</i>	Céron et al., 1994	<i>cry1A(b)/cry1A(c)</i>	10
<i>cry1Ab</i>	Valicente et al., 2010	<i>cry1Ab</i>	0
<i>cry1Ac</i>	Céron et al., 1994	<i>cry1A(c)</i>	1
<i>cry1B</i>	Céron et al., 1994	<i>cry1B</i>	1
<i>cry1C</i>	Céron et al., 1994	<i>cry1C</i>	0
<i>cry1D</i>	Céron et al., 1994	<i>cry1D</i>	0
<i>cry1Ea/cry1Eb</i>	Céron et al., 1995	<i>cry1Ea/cry1Eb</i>	0
<i>cry1Fa/cry1Fb</i>	Céron et al., 1995	<i>cry1Fa/cry1Fb</i>	0
<i>cry1Fa1/cry1Fb</i>	Valicente et al., 2010	<i>cry1Fa1/cry1Fb</i>	0
<i>cry1Fb</i>	Valicente et al., 2010	<i>cry1Fb</i>	0
<i>cry1G</i>	Céron et al., 1995	<i>cry1G</i>	0
<i>cry 1I</i>	Silva-Fagundes, dado não publicado	<i>cry 1I</i>	0
<i>cry 2Aa</i>	Silva-Fagundes, dado não publicado	<i>cry 2Aa</i>	9
<i>cry 2Ab</i>	Silva-Fagundes, dado não publicado	<i>cry 2Ab</i>	2
<i>cry 2Ac</i>	Silva-Fagundes, dado não publicado	<i>cry 2Ac</i>	0
<i>cry 2Ad</i>	Silva-Fagundes, dado não publicado	<i>cry 2Ad</i>	0
<i>cry 9</i>	Silva-Fagundes, dado não publicado	<i>cry 9</i>	27
<i>cry 9Aa</i>	Silva-Fagundes, dado não publicado	<i>cry 9Aa</i>	0

De todas as cepas analisadas com *primers* que amplificam genes *cyt*, os genes *cyt1Aa/cyt1Ab/cyt1Ba*, resultante da amplificação do *primer* *cyt1*, foram os mais frequentes (5%) seguido de *cyt1Ab*, *cyt1Aa*, *cyt2Aa/cyt2Ba/cyt2Bb/cyt2Ca*, *cyt2Bc/cyt2Ba*, *cyt2Ba*, todos com 2% de



frequência. (Tabela 10). A frequência desses genes nas cepas coletadas foi de 6,45%, frequência essa baixa, mas superior a encontrada por Costa (2011) que encontrou em 500 cepas analisadas apenas 7 cepas (1,4%) caracterizadas com genes *cyt*. O autor relata que quando comparada com genes *cryI* específicos a lepidópteros, a frequência dos genes *cyt*, que são específicos para insetos dípteros, é baixa. Das cepas que apresentaram o gene díptero-específico, o trabalho anterior encontrou 3 delas contendo as duas classes (*cyt1* e 2) e 4 contendo apenas uma e nas cepas analisadas nesse trabalho foram encontradas apenas 1 cepa contendo as duas classes. Corroborando com os resultados obtidos, Costa et al. (2010) caracterizou 640 cepas de Bt e não encontrou nenhum gene *cyt* na coleção analisada.

Tabela 10 Número de cepas amplificadas com os genes *cyt*

<i>Primers</i>	Referencial	Genes Amplificados	Nº de cepas
<i>cyt1</i>	Ibarra et al., 2003	<i>cyt1Aa/cyt1Ab/cyt1Ba</i>	3
<i>cyt1Ab</i>	Costa, dado não publicada	<i>cyt1Ab</i>	1
<i>cyt1Aa</i>	Costa, dado não publicada	<i>cyt1Aa</i>	1
<i>cyt2</i>	Ibarra et al., 2003	<i>cyt2Aa/cyt2Ba/cyt2Bb/cyt2Ca</i>	1
<i>cyt2B</i>	Costa, dado não publicada	<i>cyt2Bc/cyt2Ba</i>	1
<i>cyt2Ba</i>	Costa, dado não publicada	<i>cyt2Ba</i>	1

Dos genes *vip* amplificados com *primers* descritos anteriormente, o único que obteve ampliações nas cepas analisadas, foi o *vip3* com frequência de 9,67%. Dos *primers* que obtiveram especificidade indicada pelo sequenciamento e análise por BLAST para genes *vip3*, 56% das cepas apresentaram ampliações para o gene *vip3Aa*, resultante do *primer* Vip3Af1, 18% das cepas apresentaram ampliações específicas do gene *vip3D*, resultante do *primer* Vip3Ae1, e 1,61% das cepas amplificaram o gene *vip3Aa*.

Yu et al. (2011) encontraram uma maior frequência de *vip3* (67.4%), seguido do gene *vip2* (14.6%) e *vip1* (8.1%). Hernández-Rodríguez et al. (2009) e Espinasse et al. (2003) corroboram com os resultados obtidos tendo *vip3* a maior porcentagem dentro dos genes *vip* analisados, aproximadamente 50% das cepas enquanto *vip1* e *vip2* corresponderam a 10%.

Tabela 11 Número de cepas amplificadas com genes *vip*

<i>Primers</i>	Referencial	Genes Amplificados	Nº de cepas
<i>vip2</i>	Hernández-Rodríguez et al., 2009	<i>vip2</i>	0
<i>vip3</i>	Hernández-Rodríguez et al., 2009	<i>vip3</i>	6
<i>vip3'</i>	Espinasse et al., 2003	<i>vip3</i>	0
<i>vip3Aa</i>	Rodrigues, dado não publicado	<i>vip3Aa</i>	1
<i>vip3Ba1</i>	Rodrigues, dado não publicado	<i>vip3Aa</i>	0
<i>vip3Ab2</i>	Rodrigues, dado não publicado	<i>vip3D</i>	0
<i>vip3Ae1</i>	Rodrigues, dado não publicado	<i>vip3D</i>	11
<i>vip3Af1</i>	Rodrigues, dado não publicado	<i>vip3Aa</i>	35
<i>vip3Ah1</i>	Rodrigues, dado não publicado	<i>vip3Ah1</i>	0

Os genes mais abundantes nesta coleção de cepas de *B. thuringiensis*, considerando *cry*, *cyt* e *vip* foram: *cry1Ab* (primer *Cry1A5*), *vip3Aa* (primer *Vip3Af1*) e *cry9*, com 63%, 56% e 43% respectivamente (Tabela 12). Seifinejad et al. (2008) caracterizou cepas isoladas em diferentes regiões do Irã e observou que os genes mais abundantes foram *vip3Aa* (82,6% das cepas) seguido de *cry2* (56,5%), *cry1* (49%) e *cry9* (30%).

Tabela 12 Distribuição de genes *cry*, *cyt* e *vip* de cepas de *B. thuringiensis* por área de coleta

	<i>Primers</i>																	
	<i>cry</i> 1A5	<i>cry</i> 1Aa/ <i>cry</i> 1Ad	<i>cry</i> 1Ab/ <i>cry</i> 1Ac	<i>cry</i> 1Ac	<i>cry</i> 1B	<i>cry</i> 2Aa	<i>cry</i> 2Ab	<i>cry</i> 9	<i>cyt</i> 1	<i>cyt</i> 1Ab	<i>Cyt</i> 1Aa	<i>cyt</i> 2	<i>cyt</i> 2B	<i>cyt</i> 2Ba	<i>vip</i> 3	<i>vip</i> 3Aa	<i>vip</i> 3Ae1	<i>vip</i> 3Af
Palha																		
Pinheiro	37	0	7	1	0	8	0	21	3	1	1	1	1	0	2	0	11	35
Pivô	0	1	2	0	1	0	1	5	0	0	0	0	0	1	4	0	0	0
Lagoa	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Várzea	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Usina																		
Desativada	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Solo																		
Pinheiro	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL																		
(%)	62,90	4,83	16,12	1,61	1,61	14,51	3,22	43,51	4,83	1,61	1,61	1,61	1,61	1,61	9,67	1,61	17,74	56,45

A quantidade de genes identificados em cada cepa variou bastante, sendo identificadas cepas que não amplificaram nenhum dos genes analisados (cepas 43PC, 48PC, 53PC, 55PC, 57LA e 59VA). Entre cepas que amplificaram genes, a variação foi de 1 à 8 genes por cepa (Figura 18).

As cepas 27PP, 3PP e 30PP apresentaram mais genes sendo a cepa 27PP a única a apresentar as duas classes de *cyt*, apresentando também *vip3Aa*, *cry1Ab* e *cry9*. A cepa 3PP e 30PP amplificaram duas classes de *vip3* (*vip3Aa* e *vip3D*), *cry1Ab*, *cry2Aa* e *cry9* tendo como diferença os genes *cyt1Aa/1Ab/1Ba* amplificado apenas pela cepa 3PP e *cry1Ac* amplificado pela cepa 30PP (Figura 19). Apesar de encontrados vários genes, as cepas não apresentaram altas taxas de mortalidade sugerindo uma não tradução dessas proteínas tóxicas, algum silenciamento gênico ou até mesmo um distúrbio na ativação ou ligação dessas toxinas aos receptores específicos da membrana do inseto.

A cepa 49PC amplificou apenas 1 gene, sendo esse *cyt2Ba* (dado não mostrado). Estudos apontam uma ação sinérgica entre as toxinas Cyt e Cry, não relatando toxicidade apenas de proteínas Cyt (OESTERGAARD et al., 2007). Apesar disso, pode ser observado que a cepa 49PC teve uma ação inseticida contra *S. frugiperda* de  $10,42 \pm 2,08\%$ . Esse resultado sugere existir outros genes *cry* não identificados nessa caracterização que constituem o genoma total dessa cepa.

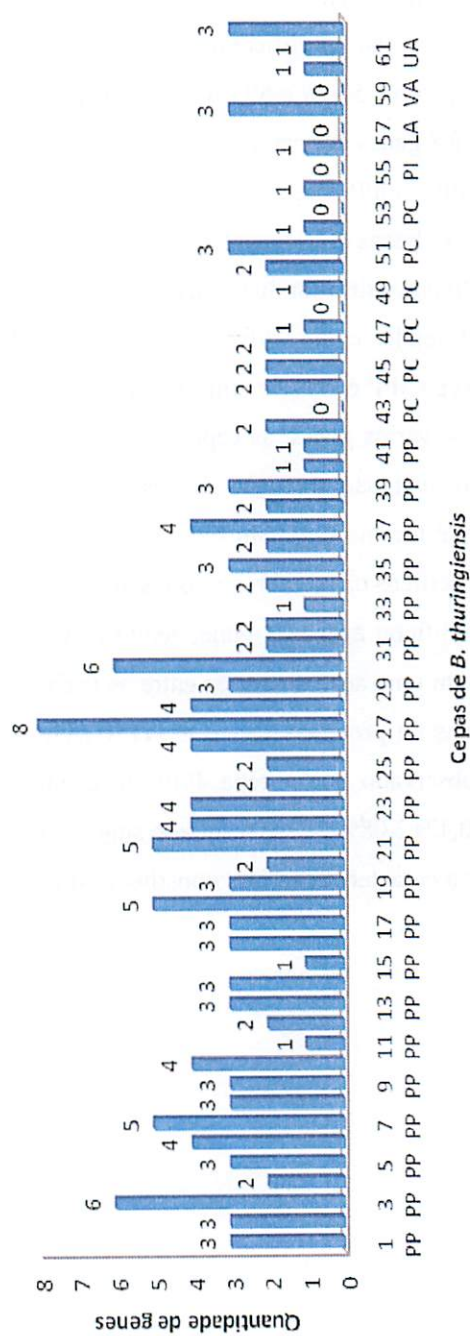


Figura 18 Quantidade de genes por cepas de *B. thuringiensis* coletada

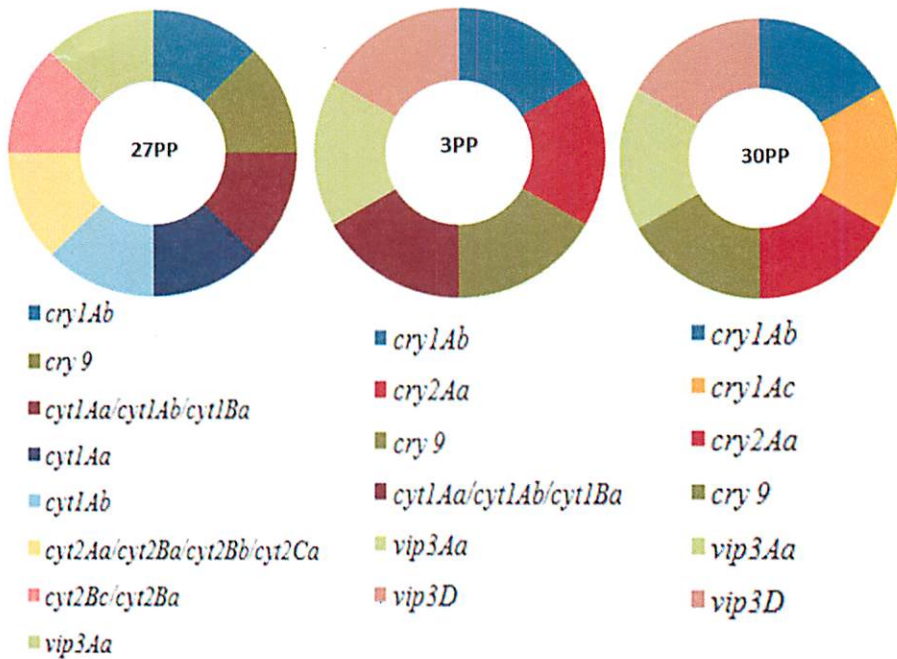


Figura 19 Cepas provenientes da palha do pinheiro (PP) com sua caracterização de genes

#### 4.4 Bioensaio de mortalidade para *Spodoptera frugiperda*

O bioensaio de mortalidade para *S. frugiperda* teve concentração de esporos variando entre  $1,75 \times 10^7$  a  $3,2 \times 10^8$ , sendo altas suficientes para matar insetos-praga suscetíveis a cepas eficientes de *Bacillus thuringiensis* (VALICENTE; LANA, 2008).

As cepas isoladas não foram eficientes contra *S. frugiperda* (Tabela 13, Figura 20). A maioria das cepas analisadas não foi estatisticamente diferente da menor taxa de mortalidade observada que foi de 0%. As poucas cepas diferentes dessa taxa foram identificadas em um grupo com mortalidade entre 6 a 28%. A baixa proporção de cepas inativas observadas neste estudo corrobora com outros

autores atuando não só contra lepidópteros praga, mas também contra insetos praga coleópteros e dípteros (VALICENTE; BARRETO, 2003; OHBA; AIZAWA, 1986; MARTIN; TRAVERS, 1989; ABDEL-HAMEED; LANDEN, 1994).

As cepas que apresentaram taxa de mortalidade possuem cristais esféricos (e) ou bipiramidais (b) e foram coletadas da área de cultivo com pivô central (PC), palha dos pinheiros (PP), usina desativada (UA), lagoa (LA). Já nas cepas que apresentaram menores taxas de mortalidade há predominância de local de coleta da palha dos pinheiros (PP) e o formato de cristal esférico (e).

Esses resultados não podem relacionar à caracterização dos genes das cepas isoladas com sua taxa de mortalidade para o inseto praga analisado. As cepas que apresentaram menores taxas possuem variados genes e diferentes quantidades de genes por cepa. Por exemplo, a cepa 57LA não obteve nenhuma amplificação gênica enquanto a cepa 30PP amplificou para 6 diferentes genes e ambos estão no grupo de 0% de mortalidade para *S. frugiperda*. O mesmo resultado foi observado para as cepas que apresentaram as maiores taxas de mortalidade, com cepas apresentando nenhuma amplificação gênica (53PC e 55PC) até cepas amplificando 5 genes diferentes (7PP) (Tabela 13, Figuras 19 e 20).

Tabela 13 Taxa de mortalidade dos isolados de *B. thuringiensis*

Mortalidade (%)					
Isolado		Isolado		Isolado	
18	0,00±0,00 a	19	4,17±2,41 a	12	8,33±3,40 ab
20	0,00±0,00 a	22	4,17±2,41 a	29	8,33±3,40 ab
25	0,00±0,00 a	23	4,17±2,41 a	51	8,33±3,40 ab
26	0,00±0,00 a	24	4,17±2,41 a	44	8,33±4,81 ab
28	0,00±0,00 a	34	4,17±4,17 a	60	8,71±5,04 ab
30	0,00±0,00 a	41	4,17±2,41 a	10	10,42±2,08 bc
32	0,00±0,00 a	50	4,17±4,17 a	14	10,42±2,08 bc
35	0,00±0,00 a	59	4,17±2,41 a	39	10,42±2,08 bc
36	0,00±0,00 a	42	5,00±5,00 a	48	10,42±2,08 bc
37	0,00±0,00 a	2	6,25±2,08 a	49	10,42±2,08 bc
57	0,00±0,00 a	5	6,25±2,08 a	46	10,80±4,20 bc
1	2,08±2,08 a	11	6,25±3,99 a	45	12,27±4,83 c
17	2,08±2,08 a	13	6,25±2,08 a	54	12,50±4,17 c
21	2,08±2,08 a	31	6,25±2,08 a	61	12,88±4,31 c
33	2,08±2,08 a	38	6,25±3,99 a	53	14,58±2,08 c
47	2,08±2,08 a	40	6,25±3,99 a	56	17,50±0,83 c
58	2,08±2,08 a	43	6,25±3,99 a	7	19,89±1,70 c
3	4,17±2,41 a	62	6,63±4,32 a	55	20,00±8,16 c
8	4,17±2,41 a	52	6,67±2,26 a	9	20,83±2,41 c
15	4,17±2,41 a	6	8,33±0,00 ab	4	22,92±2,08 c
16	4,17±2,41 a	-	-	27	25,00±3,08 c

OBS: Médias seguidas da mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade. Formato dos cristais: (e): esférico; (ec): esférico e cubóide; (b) bipiramidal.



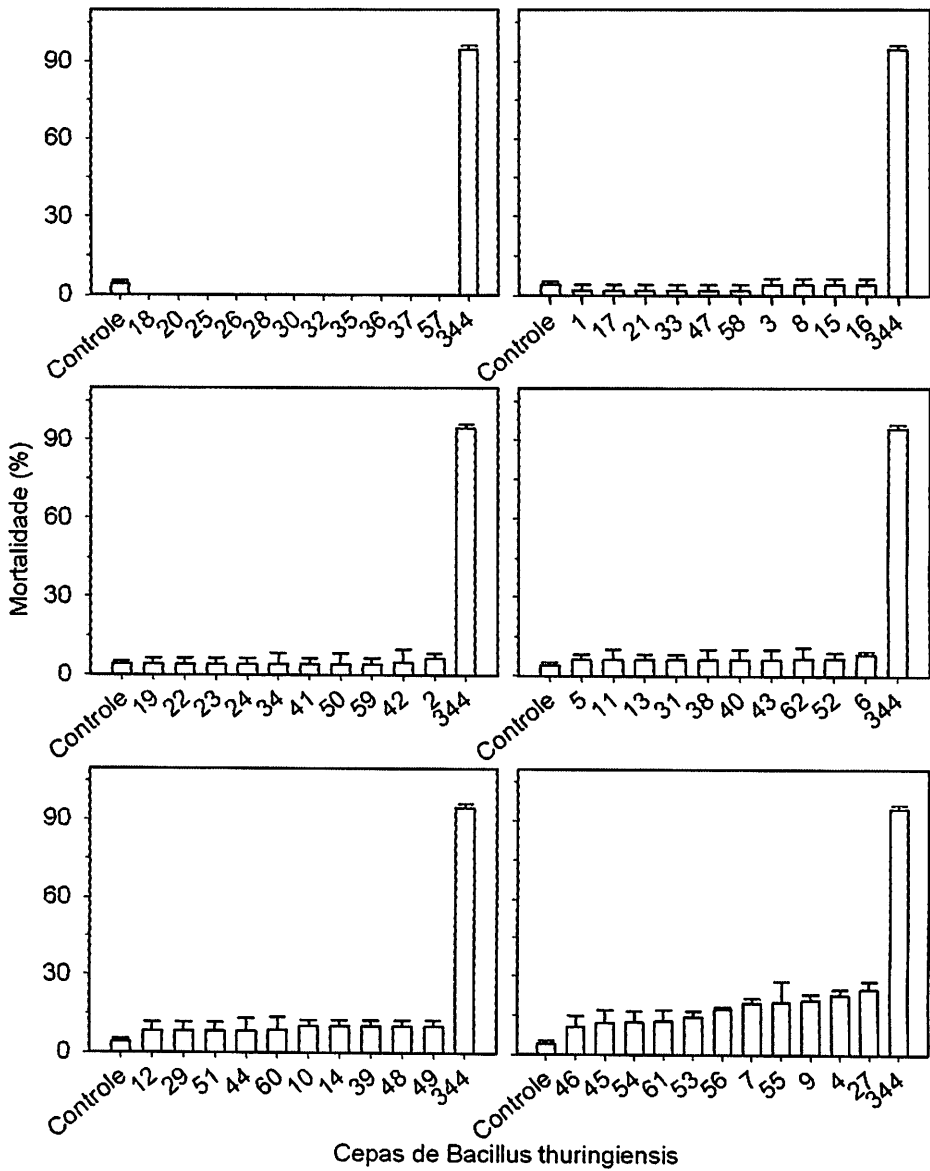


Figura 20 Taxa de mortalidade: das cepas de Bt de diferentes áreas; do controle e da cepa controle positiva, 344

Hongyu, Ziniu e Wangxi (2000) também detectaram a presença de genes *cry* em cepas de Bt que apresentavam baixa mortalidade (0 a 9%) e propuseram que provavelmente os genes não estavam sendo expressos. Silva-Werneck et al. (2008) e Loguercio et al. (2002) também encontraram baixas mortalidades em cepas de Bt com genes *vip3A* para lepidópteros praga. Segundo Estruch et al. (1996) e Loguercio et al. (2002) a eficiência da proteína Vip3Aa tem sua eficiência bastante aumentada quando expressa em *Eschericia coli*, chegando a 100% de mortalidade contra *S. frugiperda*.

A correlação entre locais de origem das cepas e formato dos cristais com taxas de mortalidade também não puderam ser relacionadas. Corroborando com os dados obtidos, Bernhard et al. (1997) concluíram que a atividade inseticida das cepas de Bt não parecem estar correlacionadas com seu local de origem, além de confirmar as observações de que *B. thuringiensis* não tóxico é comumente encontrado em solos naturais (BEL et al., 1997; OHBA; AIZAWA 1986; OHBA; YU; AIZAWA, 1988; HASTOWO; LAY; OHBA, 1992).

Outros autores obtiveram resultados que associavam a toxicidade das cepas de Bt ao formato dos cristais e genes inseridos. Glare e O'Callaghan (2000) e Robaina, Capalbo e Nascimento (2009) observaram que os cristais bipiramidais geralmente se associam com cepas tóxicas a insetos lepidópteros e a presença da proteína Cry1. Já os cristais cubóides e ovais são ativos tanto para lepidópteros quanto para dípteros e o cristal cubóide está relacionado com Cry2. Gitahy et al. (2007) relataram que a maioria dos cristais de *B. thuringiensis* tóxicos a insetos lepidopteros é composto de proteínas de aproximadamente 130 kDa, correspondente ao tamanho da  $\delta$ -endotoxina Cry 1, geralmente associada com a morfologia de cristal bipiramidal.

Valicente e Barreto (2003) relacionaram a caracterização de genes com a mortalidade larval de *S. frugiperda* e observaram que cepas que abrigam os genes *cry1C*, *cry1B*, *cry1E*, *cry1F*, *cry1A*, *cry1G* e *cry1D* foram mais tóxicos ao inseto

praga. Entre os genes *cry1*, *cry1C*, *cry1D*, *cry1E* e *cry1F* exibiram a maior atividade contra a mesma espécie (CHAMBERS et al., 1991; MOAR et al., 1990).

Segundo Valicente et al. (2010) cepas de Bt com genes *cry1D* foram considerados menos tóxicos para *S. frugiperda*, mas mortalidades variando de 95% a 100 % foram observados em 28 cepas com esse gene. Isto sugere a presença de outros genes cujas proteínas apresentam potencial efeito sobre a mortalidade larval desse inseto, uma possível interação entre diferentes proteínas Cry, ou diferenças nas respostas à proteína Cry1D. Outros relatos apontaram *cry1D* e *cry1C* (CERÓN et al., 1995), e *cry1D*, *cry1E* e *cry1F* (BOHOROVA et al., 1997) como mais eficientes no controle de larvas de *S. frugiperda*.

Contrário aos resultados obtidos onde foram encontrados cepas com ampliações de genes, mas não foram efetivas contra lepidoptera, Valicente et al. (2010) encontraram cepas de Bt que não amplificavam genes *cry1* mas que apresentavam frequência elevada taxa de mortalidade larval. Ambos os resultados sugerem a existência de outros genes ou interações que possam resultar em um eficiente controle de *S. frugiperda*.

## 5 CONCLUSÕES

As cepas de *B. thuringiensis* coletadas da palha da área do pinheiro foram responsáveis por 67,74% do total de bactérias coletadas, sendo a área de cultivo com pivô central responsável por 20,96%.

Em áreas de cerrado e em lavouras para pecuária não foram isolados colônias de *B. thuringiensis*.

A maior frequência de formato de cristais foi os esféricos correspondendo a 64,5%, seguido de 29% de formato esférico e cubóide e 6,5% de formato bipiramidal.

A diversidade genética encontrada nas cepas foram distribuídas em 4 grupos, considerando ponto de corte de 43%. Esses agrupamentos apresentaram relação com os locais de origem das cepas e o formato do cristal.

Os genes mais abundantes encontrados nas cepas de *B. thuringiensis* dessa coleção foram *cry1Ab* (63%), *vip3Aa* (56%) e *cry9* (43%).

Os genes *cry1C*, *cry1D*, *cry1Ea/Eb*, *cry1Fa/Fb*, *cry1Fal/Fb*, *cry1Fb*, *cry1G*, *cry1I*, *cry2Ac*, *cry2Ad*, *cry9Aa*, *vip2*, *vip3* (primer *vip3'*), *vip3Aa* (primer *vip3Ba1*), *vip3D* (primer *vip3Ab2*) e *vip3Ah1* (primer *vip3Ah1*). não foram encontrados entre as cepas analisadas.

Todas as cepas testadas para toxicidade a *S. frugiperda* foram significativamente ineficientes sendo as maiores taxas de mortalidade entre  $12,27 \pm 4,83$  e  $22,92 \pm 2,08$ .

## 6 REFERÊNCIAS

ABDEL-HAMEED, A.; LANDEN, R.. Studies on *Bacillus thuringiensis* strains isolated from Swedish soils: insect toxicity and production of *B. cereus* diarrhoel-tvPe enterotoxin. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 10, p. 406-409, 1994.

AGROFIT. **Sistema de agrotóxicos fitossanitários**. 2003. Disponível em: <[http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em: 23 maio 2011.

ALCÂNTARA, E. P. et al. *Bacillus thuringiensis* d-endotoxin binding to brush border membrane vesicles of rice stem borers. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 55, p. 169-177, 2004.

ALI, S. et al. *Bacillus thuringiensis* and its application in agriculture. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 14, p. 2022-2031, Apr. 2010.

ALLWIN, L.; KENNEDY, J. S.; RADHAKRISHNAN, V. Characterization of different geographical strains of *Bacillus thuringiensis* from Tamil Nadu. **Research Journal of Agriculture and Biological Sciences**, v. 3, n. 5, p. 362-366, 2007.

ANDERSON, I. C.; CAIRNEY, J. W. G. Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 6, n. 8, p. 769-779, 2004.

ANGSUTHANASOMBAT, C., CRICKMORE, N.; ELLAR, D. J. Comparison of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* CryIVA and CryIVB cloned toxins reveals synergism in vivo. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 73, n. 1/2, p. 63-68, 1992.

ANILKUMAR, K. J. A. et al. Production and characterization of *Bacillus thuringiensis* CryIAc-resistant cotton bollworm *Helicoverpa zea* (Boddie). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, n. 2, p. 462-469, 2008.

ARONSON, A. I.; SHAI, Y. Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 195, n. 1, p. 1-8, 2001.

ÁVILA, C. J.; DEGRANDE, P. E.; GOMEZ, S. A. Insetos-pragas: reconhecimento, comportamento, danos e controle. In: MILHO: informações técnicas. Dourados: EMBRAPA-CPAO, 1997. p. 157-181. (EMBRAPA-CPAO. Circular técnica, 5).

ÁVILA, C. J.; PARRA, J. R. P. Influência de fatores físicos edáficos sobre pragas de solo. In: SALVADORI, J. R.; ÁVILA, C. J.; SILVA, M. T. B. da (Ed.). **Pragas de solo no Brasil**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2004. p. 69-98.

BECKER, N. Bacterial control of vector-mosquitoes and black flies. In: CHARLES, J. F.; DELE' CLUSE, A.; NIELSEN-LEROUX, C. (Ed.). **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 383-398.

BEEGLE, C. C.; YAMAMOTO, T. Invitation paper (C.P. Alexander Fund): history of *Bacillus thuringiensis* Berliner research and development. **Canadian Entomologist**, Ottawa, v. 124, n. 4, p. 587-616, 1992.

BEL, Y. F. et al. Distribution, frequency and diversity of *Bacillus thuringiensis* in olive tree environments in Spain. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 20, p. 652- 658, 1997.

BERLINER, E. Ueber die Schlattsucht der Mehlmottenraupe. **Zeitschrift fuer Gesamte, Getreidewesenm**, v. 25, p. 3.160-3.162, 1911.

BERNHARD, K. et al. Natural isolates of *B. thuringiensis*: worldwide distribution, characterization and activity against insect pests. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 70, n. 1, p. 59-68, 1997.

BERRY, C. et al. Complete sequence and organization of pBtoxis, the toxin-coding plasmid of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israeliensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 10, p. 5082-5095, 2002.

BERRY, C. et al. Isolation, characterization and expression of a novel vegetative insecticidal protein gene of *Bacillus thuringiensis*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 243, n. 2, p. 467-472, 2005.

BOHOROVA, N. et al. Susceptibility of four tropical maize pests to *Bacillus thuringiensis* CryI-type insecticidal toxins. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 90, p. 412-415, 1997.

BOONSERM, P. et al. Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 348, n. 2 p. 363-382, 2005.

BOONSERM, P. et al. Structure of the functional form of the mosquito larvicidal Cry4Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* at a 2.8-Å resolution. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 188, n. 9, p. 3391-3401, 2006.

BRADSHAW, R. E.; FOSTER, S. J.; MONAHAN, B. J. Molecular diagnostic tools for detection of plant pathogenic fungi. In: RAO, J. R.; FLEMING, C. C.; MOORE, J. E. (Ed.). **Molecular diagnostics: current technology and applications**. Norfolk: Horizon Bioscience, 2006. cap. 2, p. 47-69.

BRAVO, A. et al. Characterization of *cry* genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 12, p. 4965-4972, 1998.

BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERÓN, N. M. *Bacillus thuringiensis* mechanisms and use. In: \_\_\_\_\_. **Comprehensive molecular insect science**. Amsterdam: Elsevier, 2005. p. 175-206.

BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, Elmsford, v. 49, n. 4, p. 423-435, 2007.

BRAVO, A. et al. N-terminal activation is an essential early step in the mechanism of action of the *B. thuringiensis* Cry1Ac insecticidal toxin. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 277, p. 23985-23987, 2002.

BRIDGE, P. D.; ARORA, D. K. Interpretation of PCR methods for species definition. In: BRIDGE, P. D. et al. (Ed.). **Application of PCR in mycology**. Wallingford: CAB International, 1998. p. 63-84.

BRUIJN, F. J. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergeneric consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, n. 7, p. 2180-2187, 1992.

BUSATO, G. R.; GRUTZMACHER, A. D.; GARCIA, M. S. Biologia comparada de populações de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em folhas de milho e arroz. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 34, n. 5, p. 743-750, 2005a.

BUSATO, G. R.; GRUTZMACHER, A. D.; GARCIA, M. S. Exigências térmicas e estimativa do número de gerações dos biótipos 'milho' e 'arroz' de *Spodoptera frugiperda*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 4, p. 329-335, 2005b.

BUSATO, G. R. et al. Preferência para alimentação de biótipos de *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) por milho, sorgo, arroz e capim-arroz. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 10, n. 2, p. 215-218, abr./jun. 2004.

BUTKO, P. Cytolytic toxin Cyt1A and its mechanism of membrane damage: data and hypotheses. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 5, p. 2415-2422, 2003.

CÁRDENAS, M. I. et al. Selección de toxinas cry contra *Trichoplusia ni*. **Ciencia Uanl**, v. 4, p. 51-62, 2001.

CARNEIRO, A. A. et al. **Caracterização molecular de fungos entomopatogênicos utilizados no controle biológico de pragas do milho - *Beauveria bassiana* versus *Spodoptera frugiperda***. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2004. 10 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Comunicado técnico, 93).

CERÓN, J. L. et al. PCR analysis of the cryI insecticidal crystal family genes from *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, p. 353-356, 1994.

CERÓN, J. et al. Specific PCR primers to identify cryI and cryIII genes within a *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 1, p. 3826-3831, 1995.

CHAMBERS, J. A. et al. Isolation and characterization of a novel insecticidal crystal protein gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 173, n. 13, p. 3966-3976, 1991.

CHIARADIA, L. A. Lagarta-do-cartucho. **O Cooperalfa**, Xanxerê, v. 226, p. 17, 2007.

CHIARADIA, L. A. Manejo de pragas da cultura do milho. In: WORDELL FILHO, J. A.; ELIAS, H. T. (Org.). **A cultura do milho em Santa Catarina**. Florianópolis: Epagri, 2010. p. 274-336.



CHILCOTT, C. N.; ELLAR, D. J. Comparative toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystal proteins in vivo and in vitro. **Journal of General Microbiology**, London, v. 134, n. 9, p. 2551-2558, 1988.

CIA, E.; FREIRE, E. C.; SANTOS, W. J. **Controle do algodoeiro: monitoramento e controle**. Piracicaba: Potafós, 1999.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos: safra 2010/2011: oitavo levantamento**. Brasília, 2011.

COSTA, C.; IDE S.; SIMONKA, C. E. **Insetos imaturos: metamorfose e identificação**. Ribeirão Preto: Holos, 2006.

COSTA, J. R. V. et al. Atividade tóxica de isolados de *Bacillus thuringiensis* a larvas de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 39, n. 5, p. 757-766, set. 2010.

COSTA, M. L. M. **Caracterização molecular de genes *cyt* de cepas de *Bacillus thuringiensis* e avaliação da toxicidade de proteínas inseticidas contra *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae)**. 2011. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

CRICKMORE N. et al. Revision of nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 62, n. 3, p. 807-813, 1998.

CRICKMORE, N. et al. **Bacillus thuringiensis toxin nomenclature**. Disponível em: <[http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil\\_Crickmore/Bt/](http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/)>. Acesso em: 19 de maio de 2011.

CRUZ, C. D. **Programa genes: versão windows; aplicativo computacional em genética e estatística**. Viçosa, MG: UFV, 2001.

CRUZ, C. D.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 2. ed. rev. Viçosa, MG: UFV, 2006.

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

CRUZ, I. Manejo de pragas da cultura do milho. In: CRUZ, J. C. et al. (Ed.). **A cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2008. cap. 12, p. 303-362.

CRUZ, I. Manejo integrado de Spodoptera frugiperda em milho. In: REUNIÃO TÉCNICA CATARINENSE DE MILHO E FEIJÃO, 6., 2007, Concórdia. **Resumos expandidos...** Concórdia: EPAGRI: CEPAP, 2007. 1 CD-ROM.

CRUZ, I.; VIANA, P. A.; WAQUIL, J. M. **Cultivo do milho: pragas da fase vegetativa e reprodutiva.** Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2002. 8 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Comunicado técnico, 49).

CTNBio. **Conselho Técnico Nacional de Biossegurança.** Disponível em: <<http://www.ctnbio.gov.br/>>. Acesso em; 19 maio 2011.

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

DELUCCA, A. J.; SIMONSON, J. G.; LARSON, A. D. *Bacillus thuringiensis* distribution in soils of the United States. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 27, n. 9, p. 865-870, 1981.

DONOVAN, W. P.; DONOVAN, J. C.; ENGLEMAN, J. T. Gene knockout demonstrates that vip3A contributes to the pathogenesis of *Bacillus thuringiensis* toward *Agrotis ipsilon* and *Spodoptera exigua*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 78, n. 1, p. 45-51, 2001.

EFRON, B.; TIBSHIRANI, R. **An introduction to the bootstrap.** Boca Raton: Chapman & Hall, 1993.

ESPINASSE, S. et al. Occurrence and linkage between secreted insecticidal toxins in natural isolates of *Bacillus thuringiensis*. **Current Microbiology**, New York, v. 47, n. 6, p. 501-507, 2003.

ESTRUCH, J. J. et al. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 93, n. 11, p. 5389-5394, 1996.

FANG, J. et al. Characterization of chimeric *Bacillus thuringiensis* Vip3 toxins. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, n. 3, p. 956-961, 2007.

FATORETTO, J. C. et al. Associação de bioensaios e caracterização molecular para seleção de novos isolados de *Bacillus thuringiensis* efetivos contra

*Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 36, n. 5, p. 737-745, 2007.

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

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220 p. (EMBRAPA CENARGEN. Documentos, 20).

FISCHHOFF, D. A. et al. Insect tolerant transgenic tomato plants. **Nature Biotechnology**, New York, v. 5, p. 807-813, 1987.

FRANCO-RIVERA A. et al. Molecular characterization of *Bacillus thuringiensis* strains from Argentina. **Antoine van Leeuwenhoek**, v. 86, p. 87-92, 2004.

GALITSKY, N. et al. Structure of the insecticidal bacterial d-endotoxin CryBb1 of *Bacillus thuringiensis*. **Acta Crystallographica**, Copenhagen, v. 57, n. 8, p. 1101-1109, 2001.

GALLO, D. et al. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920 p. il. (FEALQ. Biblioteca de Ciências Agrárias Luiz de Queiroz, 10).

GARCZYNSKI, S. F.; CRIM J. W.; ADANG, M. J. Identification of a putative brush border membrane-binding molecules specific to *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins by protein blot analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 27, n. 10, p. 2816-2820, 1991.

GEORGHIOU, G. P., WIRTH, M. C. Influence of exposure to single versus multiple toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* on development of resistance in the mosquito *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 3, p. 1095-1101, 1997.

GERK, A. O.; KITAJIMA, E. W.; SOUZA, M.L. Identificação e caracterização de isolado brasileiro do vírus da poliedrose nuclear da lagarta do cartucho-do-milho. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, São Paulo, v. 26, n. 3, p. 507-515, 1997.

GILL, S. S.; SINGH, G. J.; HORNUNG, J. M. Cell membrane interaction of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* cytolytic toxins. **Infection and Immunity**, Washington, v. 55, n. 5, p. 1300-1308, 1987.

GILSON, E.; PERRIN, D.; HOFNUNG, M. DNA polymerase I and a protein complex bind specifically to E. coli palindromic unit highly repetitive DNA: implications for bacterial chromosome organization. **Nucleic Acids Research**, London, v. 18, n. 3, p. 3941-3952, 1990.

GITAHY, P. et al. A Brazilian *Bacillus thuringiensis* Strain Highly Active to Sugarcane Borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 38, n. 3, p. 531-537, 2007.

GLARE, T. R.; O' CALLAGHAN, M. **Environmental and Health Impacts of *Bacillus thuringiensis israelensis***. 1998. Report for the Ministry of Health, Grasslands, New Zealand. Division, AgResearch, Lincoln. Disponível em: <<http://www.beyondpesticides.org/mosquito/documents/BacillusThuringiensisIsr aelensisNZ.pdf>>. Acesso em: 24 maio 2011.

GLARE, T. R.; O'CALLAGHAN M. *Bacillus thuringiensis*: biology, ecology and safety. Chichester: John Wiley, 2000.

GOMEZ, S. A; MOSCARDI, F.; SOSAGOMEZ, D. R. Suscetibilidade de *Spodoptera frugiperda* a isolados geográficos de um vírus de poliedrose nuclear. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 9, p. 1539-1544, 1999.

GONZÁLES, J. M. J.; BROWN, B. S.; CARLTON, B. C. Transfer of *Bacillus thuringiensis* to *Bacillus cereus*. **Proceedings of the National Academy of Science**, Washington, v. 79, n. 22, p. 6951-6955, 1982.

GREENE, G. L.; LEPPLA, N. C.; DICKERSON, W. A. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial médium. **Journal of Economic Entomology**, Coolege Park, v. 69, n. 4, p. 487-488, 1976.

GROCHULSKI, P. et al. *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 254, n. 3, p. 447-464, 1995.

GUERCHICOFF, A.; UGALDE, R. A.; RUBINSTEIN, C. P. Identification and characterization of a previously undescribed *cyt* gene in *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 7, p. 2716-2721, 1997.

HABIB, M. E. M.; ANDRADE, C. F. S. Bactérias entomopatogênicas. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 383-446.

HAN, S. et al. Evolution and mechanism from structures of an ADP-ribosylating toxin and NAD complex. **Nature Structural Biology**, New Yor, v. 6, n. 10, p. 932-936, 1999.

HANSEN, B. M.; SALAMITOU, S. Virulence of *Bacillus thuringiensis*. In: CHARLES, J. F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LE ROUX, C. (Ed.). **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2000.

HASTOWO, S.; LAY, B. W.; OHBA, M. Naturally occurring *Bacillus thuringiensis* in Indonésia. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 73, n. 2, p. 108-113, 1992.

HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C. S. Screening and identification of vip genes in *Bacillus thuringiensis* strains. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 107, p. 219-225, 2009.

HIGGINS, C. F.; McLAREN, R. S.; NEWBURY, S. F. Repetitive extragenic palindromic sequences, mRNA stability and gene expression: evolution by gene conversion?: a review. **Gene**, Amsterdam, v. 72, n. 1/2, p. 3-14, 1988.

HIGGINS, D. G. et al. A novel intercistronic regulatory element of prokaryotic operons. **Nature**, London, v. 298, p. 760-762, 1982.

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

HONGYU, Z.; ZINIU, Y.; WANGXI, D. Composition and ecological distribution of Cry proteins and their genotypes of *Bacillus thuringiensis* isolates from warehouses in China. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 76, n. 3, p. 191-197, 2000.

HOORFAR, J. et al. Practical considerations in design of internal amplification controls for diagnostic PCR assays. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, n. 5, p. 1863-1868, 2004.

HOSSAIN, M. A.; AHMED S.; HOQUE, S. Abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* in the agricultural soil of Bangladesh. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 70, n. 3, p. 221-225, 1997.

HUANG, D. F. et al. Microbial control and biotechnology research on *Bacillus thuringiensis* in China. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 95, n. 3, p. 175-180, 2007.

HULTON, C. S. J.; HIGGINS, C. F.; SHARP, P. M. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enteric bacteria. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 5, n. 4, p. 825-834, 1991.

IBARRA, J. et al. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Latin America with insecticidal activity against different mosquito species. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 5269-5274, 2003.

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

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

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

JACKSON, R. E. et al. Cross-resistance responses of Cry1Ac-selected *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) to the *Bacillus thuringiensis* protein Vip3A. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 100, n. 1, p. 180-186, 2007.

JAMES, C. **Global status of commercialized Biotech/GM crops**. Ithaca: ISAAA, 2010. (ISAAA Briefs n. 42).

JOUNG, K. B.; COTÉ, J. C. **A Review of the environmental impacts of the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis***. Saint-Jean-sur-Richelieu: Horticultural Research and Development Centre, 2000 (Technical Bulletin n. 29). Disponível em: <<http://dsp-psd.pwgsc.gc.ca/Collection/A54-9-29E.pdf>>. Acesso em: 24 maio 2011.

KING, A. B. S.; SAUNDERS, J. L. **The invertebrate pests of annual food crops in Central America**. Turrialba: Caatie, 1984.

KLERKS, M. M.; ZIJLSTRA, C.; VAN BRUGGEN, A. H. Comparison of real-time PCR methods for detection of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:H7, and introduction of a general internal amplification control. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 59, n. 3, p. 337-349, 2004.

KRATTIGER, A. F. **Insect resistance in crops: a case study of *Bacillus thuringiensis* (Bt) and its transfer to developing countries.** Ithaca: ISAAA, 1996. (ISAAA Briefs n. 2).

KURTZ, R. W. A review of Vip3A mode of action and effects on Bt Cry protein-resistant colonies of lepidopteran larvae. **Southwestern Entomologist**, Weslaco, v. 35, n. 3, p. 391-394, 2010.

LAMBERT, B. et al. Novel *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein with a silent activity against coleopteran larvae. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, n. 8, p. 2536-2542, 1992.

LAMBERT, B.; PEFFEROEN, M. Insecticidal promise of *Bacillus thuringiensis*. **BioScience**, Washington, v. 42, n. 2, p. 112-122, 1992.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. (Ed.). **Nucleic acid techniques in bacterial systematics.** Chichester: John Wiley & Sons, 1991. p. 115-175.

LEE, H. Distribution of *Bacillus thuringiensis* in Korea. In: FENG, T. Y. (Ed.). ***Bacillus thuringiensis*: biotechnology and environmental benefits.** Taiwan: Hua Shiang Yuan Publishing, 1995. v. 1, p. 201-215.

LEE, M. K. et al. The mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A differs from that of Cry1Ab d-endotoxin. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 4648-4657, 2003.

LEE, M. K.; MILES P.; CHEN, J. S. Brush border membrane binding properties of *Bacillus thuringiensis* Vip3A toxin to *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* midguts. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 339, n. 4, p. 1043-1047, 2006.

LEIDERMAN, L.; SAUER, H. F. G. A lagarta dos milharais *Laphygma frugiperda* (Abbot & Smith, 1797). **O Biológico**, São Paulo, v. 19, n. 6, p. 105-113, 1953.

LI, J.; CARROL, J.; ELLAR, D. J. Crystal structure of insecticidal  $\delta$ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature*, London, v. 353, p. 815-817, 1991.

LI, J.; PANDELAKIS, A. K.; ELLAR, D. J. Structure of the mosquitocidal  $\delta$ -endotoxin CytB from *Bacillus thuringiensis* sp. *kyushuensis* and implications for membrane pore formation. *Journal of Molecular Biology*, London, v. 254, p. 129-152, 1996.

LIMA, A. S. G. et al. Identification of new isolates of *Bacillus thuringiensis* using rep-PCR products and  $\delta$ -endotoxin electron microscopy. *Genetics and Molecular Biologic*, Ribeirão Preto, v. 25, n. 2, p. 225-229, 2002.

LIN, C. W. et al. Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and three rep-PCR methods for evaluating the genetic relatedness of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates. *Letters in Applied Microbiology*, Oxford, v. 47, n. 5, p. 393-398, 2008.

LOGUERCIO, L. L. et al. Combined analysis of supernatant-based feeding bioassays and PCR as a first-tier screening strategy for Vip-derived activities in *Bacillus thuringiensis* strains effective against tropical fall armyworm. *Journal of Applied Microbiology*, Oxford, v. 93, n. 2, p. 269-277, 2002.

LUTHY, P.; WOLFERSBERGER, M. G. Pathogenesis of *Bacillus thuringiensis* toxin. In: CHARLES, J. F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LE ROUX, C. (Ed.). *Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 167-180.

MAQBOOL, S. B. et al. Effective control of yellow rice stem borer and rice leaf folder in transgenic rice indica varieties Basmati 370 and M 7 using novel  $\delta$ -endotoxin cry2A *Bacillus thuringiensis* gene. *Molecular Breeding*, Dordrecht, v. 4, p. 501-507, 1998.

MARTIN, P. A.; TRAVERS, R. S. Worldwide abundance and distribution of *B. thuringiensis* isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 55, n. 10, p. 2436-2442, 1989.

MATRANGOLO, W. J. R.; MARTINS-DIAS, A. M. P.; CRUZ, I. Aspectos biológicos de *Campoletis flavicincta* (ASHMEAD) (Hymenoptera: Ichneumonidae) e interações com o vírus da poliedrose nuclear de *Spodoptera frugiperda*. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, Sete Lagoas, v. 6, n. 1, p. 1-16, 2007.



McCARTNEY, H. A. et al. Molecular diagnostics for fungal plant pathogens. **Pest Management Science**, Sussex, v. 59, n. 2, p. 129-142, 2003.

MEDEIROS, P. T. et al. Seleção e caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas no controle da traça-das-crucíferas *Plutella xylostella*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 11, p. 1145-1148, nov. 2005. Notas científicas.

MEENAKSHISUNDARAM, K. S.; GUJAR, G. T. Proteolysis of *Bacillus thuringiensis* subspecies kurstaki endotoxin with mid-gut proteases of some important *Lepidopterous* species. **Indian Journal of Experimental Biology**, New Delhi, v. 36, p. 593-598, 1998.

MESRATI, L. A.; TOUNSI, S.; JAOUA, S. Characterization of a novel vip3-type gene from *Bacillus thuringiensis* and evidence of its presence on a large plasmid. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 244, n. 2, p. 353-358, 2005.

MOAR, W. J. et al. Toxicity to *Spodoptera exigua* and *Trichoplusia ni* of individual P1 protoxins and sporulated cultures of *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaki HD-1 and NRD-12. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, n. 8, p. 2480-2483, 1990.

MONNERAT, R. S. et al. Differential activity and activation of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins in diamondback moth, *Plutella xylostella*. **Current Microbiology**, New York, v. 39, n. 3, p. 159-162, 1999.

MORÓN, M. A. Insetos de solo. In: SALVADORI, J. R.; ÁVILA, C. J.; SILVA, M. T. B da (Ed.). **Pragas de solo no Brasil**. Passo Fundo: Embrapa Trigo; Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2004. p. 41-68.

MORSE, R. J.; YAMAMOTO, T.; STROUD, R. M. Structure of Cry2Aa suggests an unexpected receptor binding epitope. **Structure**, Philadelphia, v. 9, n. 5, p. 409-417, 2001.

MORTON, C. et al. PCR-based fingerprinting indicates host-related genetic variation in the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia*. **Mycological Research**, Cambridge, v.107, n. 2, p. 198-205, 2003.

NEWBURY, S. F. et al. Stabilization of translationally active mRNA by prokaryotic REP sequences. **Cell**, Cambridge, v. 48, n. 2, p. 297-310, 1987.

NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n. 33, p. 10-13, 2004.

NUBEL, U. et al. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 178, n. 19, p. 5636-5643, 1996.

OESTERGAARD, J. et al. Binding of Cyt1Aa and Cry11Aa Toxins of *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* to brush border membrane vesicles of *Tipula paludosa* (Diptera: Nematocera) and subsequent pore formation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, n. 11, p. 3623-3629, 2007.

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

OHBA, M.; AIZAWA, K. Insect toxicity of *Bacillus thuringiensis* isolated from soils of Japan. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v.47, p. 12-20, 1986.

OHBA, M.; YU, Y. M.; AIZAWA, K. Occurrence of non insecticidal *Bacillus thuringiensis* flagellar serotype 14 in the soil of Japan. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 11, p. 85-89, 1988.

PÁDUA, L. E. et al. *Bacillus thuringiensis* isolated from the Philippines. **Philippine Entomologist**, Manila, v. 5, p. 185-194, 1992.

PATERNIANI, E.; NASS, L. L.; SANTOS, M. X. O valor dos recursos genéticos de milho para o Brasil: uma abordagem histórica da utilização do germoplasma. In: UDRY, C. V.; DUARTE, W. (Org.). **Uma história brasileira do milho: o valor dos recursos genéticos**. Brasília: Ed. Paralelo, 2000. p. 11-41.

PÉREZ, C. et al. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cyt1Aa synergizes Cry11Aa toxin by functioning as a membrane-bound receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 102, n. 51, p. 18303-18308, 2005.

PERLAK, F. J. et al. Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 83, p. 3324-3328, 1991.

PERLAK, F. J. et al. Genetically improved potatoes: protection from damage by Colorado potato beetles. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 22, n. 2, p. 313-321, 1993.

PINTO, L. M. N.; FIUZA, L. M. Distribuição de genes cry de *Bacillus thuringiensis* isolados de solos do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 4, p. 699-702, 2003.

POLANCZYK, R.; ALVES, S. B. *Bacillus thuringiensis*: uma breve revisão. **Agrociência**, Texcoco, v. 7, n. 2, p. 1-7, 2003.

PROMDONKOY, B.; ELLAR, D. J. Investigation of the pore-forming mechanism of a cytolytic d-endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. **Biochemical Journal**, London, v. 374, p. 255-259, 2003.

RADSTRÖM, P. et al. Strategies for overcoming PCR inhibition. In: DIEFENBACH, C. W.; DVEKSLER, G. S. **PCR primer: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003. p. 149-161.

RAMALAKSHMI, A.; UDAYASURIYAN, V. Diversity of *Bacillus thuringiensis* Isolated from Western Ghats of Tamil Nadu State, India. **Current Microbiology**, New York, v. 61, n. 1, p. 13-18, 2010.

RAMIREZ, R.; IBARRA, J. E. Fingerprinting of *Bacillus thuringiensis* type strains and isolates by using *Bacillus cereus* group-specific repetitive extragenic palindromic sequence-based PCR analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 3, p. 1346-1355, 2005.

RASKO, D. A. et al. Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 29, n. 2, p. 303-329, 2005.

RAYMOND, B. et al. *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen? **Trends in Microbiology**, Oxford, v. 18, n. 5, p. 189-194, 2010.

ROBAINA, Y. B.; CAPALBO, D. M. F.; NASCIMENTO, R. S. Caracterización de cepas de *bacillus thuringiensis* berliner y actividad biológica hacia *spodoptera frugiperda* (j. E. Smith) (lepidoptera: noctuidae) y *anticarsia gemmatalis* hübner (lepidoptera: noctuidae). **Fitosanidad**, Ciudad de la Habana, v. 13, n. 3, p. 187-192, 2009.

- ROH, J. Y. et al. *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and effective tool for insect pest control. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 17, n. 4, p. 547-559, 2007.
- SANAHUJA, G. et al. *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. Review article. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 9, n. 3, p. 283-300, 2011.
- SANCHIS, V. et al. Multiplicity of *d* endotoxinas genes with different insecticidal specificities in *Bacillus thuringiensis aizawai* 7.29. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 2, n. 2, p. 393-404, 1998.
- SANTOS, K. B. dos et al. Selection and characterization of the *Bacillus thuringiensis* strains toxic to *Spodoptera eridania* (Cramer), *Spodoptera cosmioides* (Walker) and *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera:Noctuidae). **Biological Control**, Orlando, v. 50, n. 2, p. 157-163, 2009.
- SANTOS, L. M. et al. Fertilidade e longevidade de *spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em genótipos de milho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 2, p. 345-350, 2004.
- SANTOS JÚNIOR, H. J. G. et al. Suscetibilidade de *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lep.: Noctuidae) A *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bacillaceae). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 76, n. 4, p. 635-641, 2009.
- SAS INSTITUTE. **PROC user's manual version 9.2. 6. ed.** Cary, 2002.
- SCHNEPF, E. et al. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 62, n. 3, p. 775-806, 1998.
- SEIFINEJAD, G. R. et al. Characterization of lepidoptera-active cry and vip genes in Iranian *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Biological Control**, San Diego, v. 44, n. 2, p. 216-226, 2008.
- SENA, J. A. D.; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C. S.; FERRÉ, J. Interaction of *Bacillus thuringiensis* Cry1 and Vip3A proteins with *Spodoptera frugiperda* midgut binding sites. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, n. 7, p. 2236-2237, 2009.

SHUHAIMI, M. et al. Utilization of enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) sequence-based PCR to fingerprint the genomes of *Bifidobacterium* isolates and other probiotic bacteria. **Biotechnology Letters**, Surrey, v. 23, n. 9, p. 731-736, 2001.

SHYAMALA, V.; SCHNEIDER, E.; AMES, G. F. L. Tandem chromosomal duplications: role of REP sequences in the recombination event at the joint-point. **EMBO Journal**, Oxford, v. 9, p. 939-946, 1990.

SILVA, R. B. **Caracterização molecular de *Bacillus thuringiensis* utilizando REP-PCR e perfil plasmidial**. 2009. 83 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

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

SILVA-WERNECK, J. O. et al. **Identificação de proteínas VIP3 em estirpes de *Bacillus thuringiensis* tóxicas para lepidópteros-praga**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2008. 20 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 222).

STEINHAUS, E. A. Possible use of *Bacillus thuringiensis* Berliner as an aid in the biological control of the alfalfa caterpillar. **Hilgardia**, Berkeley, v. 20, p. 259-281, 1951.

STERN, M. J.; PROSSNITZ, E.; AMES, G. F. L. Role of the intercistronic region in post-transcriptional control of gene expression in the histidine transport operon of *Salmonella typhimurium*: involvement of REP sequences. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 2. n. 1, p. 141-152, 1988.

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

TAILOR, R. et al. Identification and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin entomocidal to coleopteran and lepidopteran larvae. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 6, n. 9, p. 1211-1217, 1992.

TANG, Y.; PERSING, D. Molecular detection and identification of microorganisms. In: MURRAY, P. R. et al. (Ed.). **Manual of clinical microbiology**. Washington: ASM, 1999. cap. 13, p. 215-244.

THOMAS, W. E.; ELLAR, D. J. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* insecticidal delta-endotoxin. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 154, n. 2, p. 362-368, 1983.

VAECK, M. et al. Transgenic plants protected from insect attack. **Nature**, London, v. 328, p. 33-37, 1987.

VALADARES-INGLIS, M. C. C.; SOUZA, M. T.; SHILER, W. Engenharia genética de microrganismos agentes de controle biológico. In: MELO, I. S. de; AZEVEDO, J. L. de (Ed.). **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1998. v. 1, p. 208-217.

VALICENTE, F. H. et al. Molecular characterization and distribution of *Bacillus thuringiensis cryI* genes from Brazilian strains effective against the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. **Biological Control**, San Diego, v. 53, p. 360-366, 2010.

VALICENTE, F. H.; BARRETO, M. R. *Bacillus thuringiensis* survey in Brazil: geographical distribution and insecticidal activity against *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 32 n. 4, p. 639-644, 2003.

VALICENTE, F. H.; LANA, U. G. de P. Molecular characterization of the *Bacillus thuringiensis* (BERLINER) strains 344 and 1644, efficient against fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH). **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 7, n. 3, p. 195-209, 2008.

VALICENTE, F. H.; ZANASI, R. F. **Uso de meios alternativos para a produção de bioinseticidas à base de *Bacillus thuringiensis***. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2005. 4 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular técnica, 60).

VERSALOVIC, J.; KOEUTH T.; LUPSKI, J. R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, London, v. 19, n. 24, p. 6823-6831, 1991.

VERSALOVIC, J. et al. Genomic fingerprint of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, New York, v. 5, p. 25-40, 1994.

VILAS-BÔAS, G. F. L. T. **Diversidade e estrutura genética de populações de *Bacillus thuringiensis* e de *Bacillus cereus***. 2002. 102 f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2002.

WANG, J. et al. Characterization of cry1, cry2 and cry9 genes in *B. thuringiensis* isolates from China. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 82, n. 1, p. 63-71, 2003.

WARREN, G. W. Vegetative insecticidal proteins: novel proteins for control of corn pests. In: CAROZZI, N. B.; KOZIEL, M. G. (Ed.). **Advances in insect control: the role of transgenic plants**. London: Taylor & Francis, 1997. p. 109-121.

WOLFERSBERGER, M. G. The toxicity of two *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins to gypsy moth larvae is inversely related to the affinity of binding sites on midgut brush border membranes for the toxins. **Experientia**, Basel, v. 46, p. 475-477, 1990.

YAMAMOTO, T.; DEAN, D. H. Insecticidal proteins produced by bacteria pathogenic to agricultural pests. In: CHARLES, J. F.; DÉLECLUSE, A.; LE ROUX, C. N. (Ed.). **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application**. Dordrecht: kluwer, 2000. p. 81-100.

YANG, Y.; AMES, G. F. L. DNA gyrase binds to the family of prokaryotic repetitive extragenic palindromic sequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 85, n. 23, p. 8850-8854, 1988.

YANG, Y.; AMES, G. F. L. The family of repetitive extragenic palindromic sequences: interaction with DNA gyrase and histonelike protein HU. In: DRLICA, K.; RILEY, M. (Ed.). **The bacterial chromosome**. Washington: American Society for Microbiology, 1990. p. 211-225.

YAOI, K. et al. Aminopeptidase N of *Bombyx mori* as a candidate for the receptor of *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin. **European Journal of Biochemistry**, New York, v. 246, n. 3, p. 652-657, 1997.

YU, C. G. et al. The *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein VIP3A lyses midgut epithelium cells of susceptible insects. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, US, v. 63, n. 2, p. 532-536, 1997.

YU, X. et al. Characterization of vegetative insecticidal protein vip genes of *Bacillus thuringiensis* from Sichuan Basin in China. **Current Microbiology**, New York, v. 62, n. 3, p. 752-757, 2011.

ZARA, G. et al. PCR-based methods to discriminate *Bacillus thuringiensis* strains. **Annals of Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 71-76, 2006.

ZHANG, X. et al. A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 103, p. 9897-9902, 2006.

ZUCCHI, R. A.; SILVEIRA NETO, S.; NAKANO, O. **Guia de identificação de pragas agrícolas**. Piracicaba: FEALQ, 1993. 139 p.