

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
Bacillus thuringiensis UTILIZANDO
REP-PCR E PERFIL PLASMÍDIAL**

ROSANE BEZERRA DA SILVA

2009

ROSANE BEZERRA DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Bacillus thuringiensis*
UTILIZANDO REP-PCR E PERFIL PLASMÍDIAL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Biotecnologia Vegetal, para obtenção do título de “Mestre”.

Orientador
Dr. Fernando Hercos Valicente

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2009

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

Silva, Rosane Bezerra da.

Caracterização molecular de *Bacillus thuringiensis*
utilizando REP-PCR e perfil plasmídial / Rosane Bezerra da Silva. –
Lavras : UFLA, 2009.

83 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2009.

Orientador: Fernando Hercos Valicente.

Bibliografia.

1. *Bacillus thuringiensis*. 2. Caracterização molecular. 3. REP-
PCR. 4. Perfil plasmídial. I. Universidade Federal de Lavras. II.
Título.

CDD – 632.96
– 579.362

ROSANE BEZERRA DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Bacillus thuringiensis*
UTILIZANDO REP-PCR E PERFIL PLASMÍDIAL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Biotecnologia Vegetal, para obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 20 de fevereiro de 2009

Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva

UFLA

Dr. Edgard Augusto de Toledo Picoli

EMBRAPA Milho e Sorgo

Dr. Fernando Hercos Valicente
EMBRAPA Milho e Sorgo
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

A Deus por me permitir dar mais esse passo e pela confortável ciência de que o senhor sempre está ao meu lado em todos os momentos, não me deixando esquecer que Ele é supremo no controle de todas as coisas.

Aos meus pais, José Fernandes (in memoriam) e Maria Bezerra, meus maiores amores. A vocês, que com certeza eram e são meus maiores exemplo de honestidade, responsabilidade e fé, todo meu amor.

Ao Leonardo Botelho Fagundes, por estar ao meu lado, cercando-me de carinho e compreensão. Por ser meu companheiro e confidente, sempre me apoiando em todos os momentos.

A todos, com muito amor e sinceros sentimentos de gratidão.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Ao conquistar esta importante etapa em minha vida, gostaria de agradecer aqueles que direta ou indiretamente colaboraram para realização deste trabalho.

Agradeço primeiramente a Deus, pela saúde e presença em minha vida.

A universidade Federal de Lavras e ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, pela oportunidade.

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

Aos meus pais, pelo grande amor dedicado a mim e pelos sábios ensinamentos.

Aos meus queridos irmãos, pelo incentivo e apoio.

A Embrapa Milho e Sorgo, pela possibilidade de desenvolver esse trabalho.

Ao meu orientador, Dr. Fernando H. Valicente, pela oportunidade, confiança.

Ao Dr. Ivan Shuster, pela ajuda indispensável nas análises de dados deste trabalho.

A Dra. Elisa Serra Negra Viera, pelos conselhos que contribuíram significativamente para a realização deste mestrado.

Ao Dr. Edgard Picoli, pelas sugestões no aperfeiçoamento deste trabalho e valiosos ensinamentos.

Ao Ubiraci Lana, pela paciência e ajuda essencial na realização do experimento.

Aos amigos Osmar, Celso, Amanda e Sandra, pelas valiosas ajudas experimentais e companhia imprescindível no laboratório.

Aos colegas do laboratório de biologia molecular, pela agradável convivência e ajuda.

A todos os colegas do programa de Pós-graduação em Biotecnologia Vegetal, pelo companheirismo durante o primeiro ano.

A minha querida amiga Glacy, pela convivência, parceria e companheirismo em todos os momentos.

A Miriam e Vicente Fagundes, por me acolherem em sua família dando-me o privilégio de ser tratada como filha e pelos grandes ensinamentos de vida.

Ao Leonardo, uma pessoa especial que me trouxe luz, esperança, carinho e muito companheirismo, me apoiando sempre.

MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	i
ABSTRACT	iii
CAPÍTULO 1.....	1
1 Introdução Geral	1
2 Referencial Teórico.....	4
2.1 Ataques de insetos e pragas	4
2.2 Microorganismos endofíticos	5
2.3 <i>Bacillus thuringiensis</i> (Bt).....	5
2.4 A variabilidade genética	9
2.5 Marcadores baseados em PCR (Polymerase Chain Reaction).....	11
3 Referências Bibliográficas	13
CAPÍTULO 2: Caracterização do perfil plasmidial de <i>Bacillus thuringiensis</i>	21
1 Resumo	21
2 Abstract.....	22
3 Introdução	23
3.1 Padrão plasmidial.....	23
4 Materiais e Métodos.....	25
4.1 Extração de plasmídeos	25
4.2 Eletroforese.....	29
5 Resultados e Discussão	30
6 Conclusões	40
7 Referências Bibliográficas	41
CAPÍTULO 3: Caracterização molecular de <i>Bacillus thuringiensis</i> utilizando REP-PCR (Repetitive Element Polymorphism)	44
1 Resumo	44

2 Abstract.....	46
3 Introdução	47
3.1 O uso de sequências de DNA repetitivo em análises genéticas.....	47
4 Materiais e Métodos.....	50
4.1 Extração e purificação do DNA.....	53
4.2 PCR utilizando primer ERIC e eletroforese dos produtos da reação.....	54
4.3 PCR utilizando primer Bc-REP e eletroforese dos produtos da reação.....	55
4.4 Avaliação dos dados moleculares.....	56
4.5 Análises da diversidade genética.....	56
5 Resultados e Discussão	57
5.1 Primers ERIC.....	57
5.2 Primers Bc-REP.....	61
5.3 Análise em conjunto dos fragmentos gerados em reações com os primers ERIC e Bc-REP	64
6 Conclusões.....	80
7 Referências Bibliográficas.....	81

RESUMO

SILVA, Rosane Bezerra da. **Caracterização molecular de *Bacillus thuringiensis* utilizando REP-PCR e perfil plasmídial.** 2009. 83 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Biotecnologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.*

Os insetos constituem uma das principais causas de danos à produção agrícola no mundo. O controle de insetos tem sido realizado essencialmente por meio de agroquímicos. A bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* tem sido utilizada como alternativa de controle. É uma bactéria Gram-positiva que ocorre naturalmente no solo e produz proteínas na forma de cristais que são tóxicas a uma variedade de insetos entre as ordens Lepidoptera, Diptera, e Coleóptera. Apresenta alta variabilidade genética e está amplamente distribuída na natureza. O presente trabalho objetivou a caracterização de cepas pertencentes ao banco de *B. thuringiensis* da EMBRAPA-CNPMS, quanto ao perfil plasmídial e avaliar a diversidade genética com base nas sequências repetitivas ERIC e REP. O perfil plasmídial foi avaliado pela migração das bandas em gel de agarose sendo possível visualizar o perfil de 49 das 60 cepas utilizadas. Cepas pertencentes a uma mesma subespécie apresentaram diferentes migrações de plasmídeos, com exceção das cepas 348L e 462A pertencentes à subespécie *galleriare*. A cepa T09 *Bt tolworthi* apresentou migração plasmídial idêntica as duas cepas *galleriare* citadas à cima. Assim obtivemos 46 cepas com perfil plasmidiais distintos, fazendo desta técnica uma ferramenta útil para discriminar cepas específicas, tornando-se valiosa em termos de propriedade intelectual e reivindicações. A divergência genética entre 56 cepas foi estimada utilizando ferramenta com base em PCR com primers específicos para as sequências ERIC e REP. Sendo os fragmentos gerados analisados por eletroforese em géis de agarose ou poliacrilamida. As distâncias genéticas foram obtidas pelo complemento do coeficiente de Jaccard e os agrupamentos foram realizados pelo método UPGMA com aplicação de bootstrap para verificar a consistências dos agrupamentos. Uma segunda análise de grupos foi realizada pelo método de Tocher. Os primers ERIC e Bc-REP detectaram grande divergência genética entre as 56 cepas de *B. thuringiensis* com formação de 21 grupos quando considerado um ponto de corte de 60%. Entre estes houve valores de bootstrap acima de 50% e grupos com valores de bootstrap abaixo de 50%, parece estarem relacionados com número de bandas, que foram menores nestes casos. Alguns grupos formados com o método Tocher estavam de acordo com os grupos obtidos com o agrupamento UPGMA. Aparentemente, alguns dos

* Orientador: Fernando Hercos Valicente – Embrapa Milho e Sorgo

grupos formados parecem estar relacionados com mortalidade e procedência, necessitando mais estudos para confirmação.

ABSTRACT

SILVA, Rosane Bezerra da. **Molecular characterization of *Bacillus thuringiensis* using REP-PCR and plasmid pattern**. 2009. 83 p. Dissertation (Masters in Agronomy / Plant Biotechnology) - Federal University of Lavras, Lavras.*

The insects consist one of most important causes of damage to agricultural production in the world. The insect control has been performed essentially by the use of chemical products. The entomopathogenic bacterium *Bacillus thuringiensis* has been widely used as an alternative to chemical control. It is a Gram positive bacterium that occurs naturally in soil and produces proteins in a crystal shape, that are toxic to a variety of insects belonging to the orders Lepidoptera, Diptera, and Coleoptera. It has high genetic variability and is widely distributed in nature. To characterize strains belonging to the bank of *B. thuringiensis* of the EMBRAPA-CNPMS, plasmidial pattern and evaluate genetic diversity based on repetitive sequences ERIC and REP were used. Plasmidial pattern was evaluated by migration of the bands in agarose gel and it is possible to visualize the profile of 49 to 60 strains used. Strains belong to the same subspecies presented different pattern of plasmid migration, except the strains 348L and 462A belonging to the subspecies *galleriare*. The strain T09 *Bt tolworthi* showed identical plasmidial migration with both strains *galleriare* mentioned above. Distinct plasmidial pattern was obtained for 46 strains, and this technique becomes a useful tool to discriminate specific strains and a valuable in terms of intellectual property and claims. The genetic diversity was evaluated among 56 strains using PCR with specific primers to sequences ERIC and REP. Since the resulting fragments analyzed by electrophoresis in agarose gel or polyacrylamide The genetic distances obtained by Jaccard coefficient completion and the groups were done by method UPGM with bootstrap application to verify the consistence of the groups. Tocher method was used to analyze the second group. ERIC and Bc – REP primers detected a huge genetic diversity among 56 strains of *B. thuringiensis* with formation of 21 groups when considerate a cutoff 60%. Among these were the bootstrap values higher than 50% and groups with bootstrap values below 50%, appear to be related to number of bands, which were lower in these. Some groups formed with Tocher method were in agreement with the groups obtained with the UPGMA

*Major Professor: Fernando Hercos Valicente – Embrapa Milho e Sorgo

clustering. Apparently, some of the groups formed appear to be related to mortality and origin, requiring further study for confirmation.

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO GERAL

Há vários anos o homem vem buscando um sistema de controle de pragas menos tóxicos para os seres humanos e o meio ambiente em geral, e que apresente maior eficiência e especificidade no controle de pragas agrícolas. A bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* tem sido utilizada como alternativa dentro do controle biológico de pragas.

Bacillus thuringiensis é uma bactéria do solo que se desenvolve em condições aeróbicas em meios artificiais bastante simples. Esta bactéria entra em processo de esporulação durante a fase estacionária, acumulando assim proteínas tóxicas denominadas de proteínas Cry codificada por diversos genes *cry* (Yamamoto & Dean, 2000)

No aparelho digestivos dos insetos, que apresenta pH alcalino (pH ~10), esta proteína se solubiliza liberando assim as protoxinas que em presença das proteinases (enzimas digestivas) são convertidas em endotoxinas. Os produtos ativos das toxinas se ligam de maneira irreversível aos receptores de membrana das células epiteliais do intestino do inseto, formando poros ou canais iônicos que aumentam a permeabilidade da membrana causando lise celular. O inseto também pode morrer por inanição, uma vez que pouco tempo após a infecção este para de se alimentar (Copping & Menn, 2000). Segundo Medeiros et al., (2005) estas proteínas quando visualizadas ao microscópio eletrônico apresentam-se em forma de cristal que podem ser bipiramidais, cuboidais, romboidais, piramidais, esféricos e retangulares contendo proteínas que atuam em várias ordens de insetos como: Lepidópteros, Dípteros, Coleópteros, Hemíptera, Orthoptera e contra outros grupos de invertebrados (nematóides, ácaros e protozoários).

Em geral, os genes que codificam as proteínas Cry encontram-se nos cromossomos ou em plasmídeos de diversos tamanhos (4-150 MDa), não somente em combinações distintas ou várias cópias dentro de um plasmídeo, mas também por combinações de plasmídios presentes nas diversas cepas de *B. thuringiensis* (Lereclus et al., 1993). Estes plasmídeos são divididos em dois grupos diferentes: os menores que 30MDa e os maiores que 30MDa (megaplasmídeos), e segundo López-Meza et al. (2003) são os megaplasmídeos os responsáveis por abrigarem os genes *cry*.

A bactéria *Bacillus thuringiensis* apresenta alta variabilidade genética e estão amplamente distribuídas na natureza, sendo isolada de amostras coletadas em quase todos os ambientes onde foi procurada (Vilas Bôas, 2002). Essa variabilidade genética existente entre diferentes isolados tem sido estudada principalmente por meio da utilização de técnicas que têm como base a reação da polimerase em cadeia (PCR). A caracterização de seqüências repetitivas e conservadas nos genomas bacterianos, principalmente das seqüências REP e ERIC, tem sido realizada por meio dessa técnica, o que originou a ferramenta chamada rep-PCR (Repetitive Element Polymorphism) (Versalovic et al., 1991).

O uso de rep-PCR tem a vantagem de os primers possuírem seqüências conhecidas e já terem sido utilizados em estudos com bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Desta forma, não é necessário o conhecimento prévio da estrutura genômica de uma determinada espécie e dispensa uma seleção inicial de primers, gerando resultados em um período menor de tempo (Lima, 2002).

Neste trabalho fez-se uso de ferramentas moleculares com o objetivo de caracterizar e avaliar a divergência genética de um grupo de cepas pertencentes à coleção da Embrapa Milho Sorgo (CNPMS) localizada em Sete Lagoas MG, sendo que algumas apresentavam identificação de subespécie e outras não. Foram verificados também se as cepas pertencentes à mesma subespécie apresentavam o mesmo perfil molecular, além de se estudar possíveis relações

genéticas entre cepas com 0% e 100% de eficiência na mortalidade de *Spodoptera frugiperda*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Ataques de insetos e pragas

Cerca de 15% da safra de alimentos no mundo é perdida por causa de ataques de insetos e pragas, prejudicando assim a economia mundial (Praça et al., 2004). Dentre estas pragas destaca-se a lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Esta lagarta é a principal praga do milho em todas as regiões do Brasil e uma das principais pragas desta cultura na América do Sul, América Central e México. Ela ocorre durante todos os estádios de desenvolvimento da cultura atacando o cartucho e as folhas, podendo destruí-los completamente, e causar perdas de 15% a 37% na produtividade (Werneck et al., 2000).

Há vários anos, países industrializados têm buscado um sistema de controle menos tóxicos para os humanos e para o meio ambiente, e que apresente maior eficiência e especificidade. Esta tendência se acentuou nos últimos anos devido a uma percentagem elevada de pesticidas químicos terem sido retirados do mercado por problemas de toxicidade e danos ecológicos (Abreu, 2006).

Os inseticidas biológicos, utilizados há mais de 50 anos no Brasil, são uma alternativa para o controle seletivo de insetos nocivos. Esta prática inclui, principalmente, o emprego de microorganismos (Bobrowski et al., 2003). Atualmente, são conhecidos muitos microorganismos entomopatogênicos, como fungos, vírus e bactérias, que podem ser empregados no controle biológico de insetos e pragas (Valadares-Inglis et al., 1998). Além disso, a utilização de inseticidas biológicos no controle de pragas apresenta vantagens para o ecossistema, comparativamente com a utilização dos inseticidas químicos (Kogan, 1998; Moscardi, 1999).

O aumento do uso de produtos entomopatogênicos, só ocorreu após um grande esforço dos cientistas em desenvolverem pesquisas, para entenderem o funcionamento do mecanismo de controle mediado por estes organismos (Abreu, 2006).

2.2 Microorganismos endofíticos

Microorganismo endofíticos são aqueles que habitam o interior das plantas pelo menos um período do ciclo de suas vidas (Azevedo, 1998). No início da década de 1970, esses microorganismos eram considerados neutros, não causando danos ou benefícios as plantas. Contudo, sabe-se que, em muitos casos, desempenham um papel importante na proteção da planta contra predadores e patógenos (Azevedo et al., 2000).

Weber (1981) foi provavelmente o primeiro pesquisador a relatar a proteção de plantas a insetos devido a um fungo entomopatogênico. A partir disso, novas formas de controle biológico vêm sendo desenvolvidas com o auxílio da engenharia genética (Tester, 1992).

Atualmente, o mercado mundial de biopesticidas não chega a alcançar 5% do mercado de pesticidas. Os produtos a base de *B.thuringiensis* representam mais de 90% dos biopesticidas e são usados especialmente em países como os Estados Unidos (Polanczyk & Alves, 2003).

2.3 *Bacillus thuringiensis* (Bt)

Bacillus thuringiensis é uma bactéria do solo, Gram positiva da família Bacillaceae, que se caracteriza pela produção de inclusões protéicas cristalinas na fase estacionária do ciclo de crescimento. É uma bactéria que pode ser encontrada em vários substratos como solo, água, superfícies de plantas, insetos mortos, teias de aranha e grãos armazenados (Valicente et al., 2000; Miralles & Pérez, 2004 e Valicente & Barreto, 2003). Em 1911, Berliner isolou células de

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

A primeira tentativa de teste a campo foi conduzida por Husz (1929) através de um programa internacional de controle da lagarta europeia do milho da espécie *Ostrinia nubilalis*. Este pesquisador obteve resultados promissores com a cultura da bactéria que havia recebido de Mattes. A partir destes fatos houve por parte das indústrias o interesse no uso de organismos entomopatogênicos.

Em 1938, teve início a comercialização do primeiro produto à base de *B. thuringiensis*. Na década de 1970, já existiam no mercado produtos para o controle de Coleóptera e principalmente Lepidóptera, e foi descoberta a variedade *B. thuringiensis israelensis*, eficiente contra larvas de Díptera, que revolucionou o controle de insetos vetores de doenças. Posteriormente, variedades tóxicas a nematóides foram descobertas, embora ainda não sejam utilizadas comercialmente (Arantes et al., 2002).

O Bt desenvolve-se em condições aeróbicas em meios artificiais bastante simples. Esta bactéria entra em processo de esporulação durante a fase estacionária, acumulando assim proteínas tóxicas denominadas de proteínas Cry codificadas por diversos genes *cry* (Yamamoto & Dean, 2000).

A aplicação de grandes quantidades de produtos a base de Bt trouxe a necessidade de um maior entendimento de sua distribuição e do verdadeiro papel deste microorganismo na natureza, o que estimula uma racionalização da sua utilização (Arantes et al., 2002). Tal conhecimento pode contribuir no desenvolvimento de métodos mais eficientes de isolamento de novas cepas,

contendo novos genes *cry*, ou outros fatores de virulência ainda não conhecidos, importantes para o desenvolvimento de novos produtos biotecnológicos com potencial de utilização em programas de controle de pragas (Barreto, 2005).

O primeiro pesquisador a detectar a presença de cristais em forma de diamante em culturas esporuladas de Bt, e relaciona-los com a patogenicidade aos insetos, foi Hannay em 1953. Em 1995, Hannay & Fritz-James desenvolveram métodos para a separação e posterior análise da proteína cristal, quando obtiveram suspensões intactas, livres de outros materiais, tais como esporos e células vegetativas. Esses tipos de cristais possuíam características de proteínas e com o estudo morfológico ao microscópio eletrônico apresentaram estruturas bipiramidal.

Diversas estirpes de Bt foram isoladas no mundo inteiro e, atualmente, diversos laboratórios continuam procurando por outras novas. Hoje se conhecem estruturas de cristais nas formas bipiramidal, cuboidal, romboidal, piramidal, esférica e retangular, que pode estar associados às proteínas que atuam em várias ordens de insetos como: Lepidópteros, Dípteros, Coleópteros, Hemíptera e Orthoptera e contra outros grupos de invertebrados (nematóides, ácaros e protozoários) (Edwards et al., 1988; Feiltelson et al., 1992; Crickmore et al., 1995; Medeiros et al., 2005).

De acordo com Schnepf et al. (1998), as proteínas Cry possuem três domínios estruturais (I, II, e III), que consistem no centro tóxico ativo. A estrutura de proteínas Cry1Aa (Li et al., 1991), Cry3Aa (Grochulski et al., 1995), Cry11Bb (Gutierrez et al., 2001) sugerem alta similaridade estrutural entre elas, e, apesar da baixa homologia entre os aminoácidos, estes domínios estão compreendidos nos primeiros 623 aminoácidos da proteína.

O domínio I está envolvido na inserção da membrana, e afeta a função do canal de íons e a toxicidade (Wu e Aronson, 1992; Walters et al., 1993; Kumar & Aronson, 1999); enquanto o domínio II está envolvido na ligação ao

receptor e inserção na membrana, e atua na determinação da especificidade da proteína (Ge et al., 1989; Knowles, 1994; Lu et al., 1994). O domínio III é importante para o funcionamento do canal de íons, ligação de receptores e inserção na membrana, estabilidade da proteína e especificidade em relação ao inseto alvo (Bosch et al. 1994; Masson et al., 1994; Lee et al., 1999).

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

A patogenicidade e a especificidade de uma cepa são determinadas pelos tipos de genes *cry* funcionais que a mesma possui. Estes genes codificam para as proteínas sintetizadas na forma de protoxinas. A toxicidade das mesmas está associada ao componente N-terminal, enquanto o componente C-terminal determina a formação da estrutura do cristal (Li et al. 1991).

O aparelho digestivo dos insetos apresenta pH alcalino (pH ~10), quando os cristais protéicos entram em contato com esse pH são solubilizados liberando assim as protoxinas que em presença das proteinases (enzimas digestivas) são convertidas em endotoxinas. Os produtos ativos das toxinas se ligam de maneira irreversível aos receptores de membrana das células epiteliais do intestino do inseto, formando poros ou canais iônicos que aumentam a permeabilidade da membrana causando lise celular, o inseto também pode morrer por inanição, uma vez que pouco tempo após a infecção o inseto para de se alimentar (Hofte & Whiteley, 1989; Knowles, 1994; Copping & Menn, 2000).

Inseticidas a base de Bt que têm sido utilizados há mais de 50 anos, proporcionam inúmeras vantagens, uma delas é que pode ser considerado um agente biológico de maior potencial para o controle de insetos-praga florestais,

agrícolas e vetores de doença, graças à especificidade das δ -endotoxinas aos insetos e invertebrados alvos. Outra vantagem é a sua inocuidade aos vertebrados e meio ambiente, inclusive insetos benéficos e inimigos naturais (Krieg & Langenbruch, 1981; Monnerat & Bravo, 2000; Cárdenas et al., 2001), fazendo deste agente um componente-chave em estratégias de manejo integrado de pragas (Bravo & Quintero, 1993; Schnepf et al., 1998). Além disto, pesticidas à base de proteínas Cry têm baixo custo de desenvolvimento e registro, em relação a um novo inseticida químico sintético (Schnepf et al., 1998).

2.4 A variabilidade genética

Os genes *cry* são classificados de acordo com a sequência de aminoácidos de seus produtos e a especificidade de ação das toxinas. Por este método foram descritos cinco grupos de genes *cry* diferentes, organizados em algarismos romanos I-V (Hofte & Whiteley, 1989). Mas com o avanço da biologia molecular do Bt, novos genes *cry* foram e vêm sendo seqüenciados e catalogados, dando origem a diversas exceções dentro desta classificação. Crickmore et al. (1998) propuseram a nova classificação baseada somente na sequência de aminoácidos codificada pelos genes, não levando em consideração o perfil de toxicidade.

O número de cópias dos genes *cry* presente em uma determinada cepa de Bt pode influenciar de maneira significativa na quantidade final da proteína produzida pela bactéria. As cepas de Bt têm um grande potencial adaptativo em termos de inseto-alvo decorrente desta multiplicidade e diversidade dos cristais protéicos inseticidas. A associação de processos de conjugação e transposição dos genes *cry* seria responsável por tal diversidade (Aguiar, 2007; Gonzáles et al., 1982; Sanchis et al., 1988; Lereclus et al., 1982). Vários genes que codificam para a proteína cristal fazem parte de uma estrutura complexa, a qual inclui

vários elementos genéticos móveis, como transposons e IS (*Insertion Sequences*). (Kronstad & Whiteley, 1984; Lereclus et al., 1984)

Algumas estirpes de Bt, algumas apresentam um único gene codificador das proteínas Cry como a cepa *kurstaki* HD73 que contém somente o gene *cry1Ac* localizado em um único plasmídio de 50MDa (Lereclus et al., 1993). Outras estirpes apresentam genes diferentes, como é o caso da cepa *aizawai* 7.29 que contém cinco genes, quatro deles localizados no cromossomo ou megaplasmídios, e um quinto em um plasmídio de 45MDa (Sanchis et al., 1988). Já a subespécie *israelensis* apresentou cinco genes codificadores da δ -endotoxina e outro gene que codifica uma citolisina, todos localizados em um único plasmídeo de 72MDa (Bourgouin et al., 1988).

As diversas linhagens de Bt produzem, além das δ -endotoxinas, uma série de outras toxinas que podem ou não participar da ação entomopatogênica. Entre essas a principal é a proteína Cyt, de peso molecular 28kDa, uma citolisina de ação inespecífica, produzida principalmente pela subespécie *israelensis*, sendo acumulada no cristal juntamente com as δ -endotoxina típicas desta subespécie. Por não apresentar homologia com as demais Cry, as toxinas Cyt não são classificadas como δ -endotoxina (Lereclus et al., 1993).

Bacillus thuringiensis apresentam alta variabilidade genética e estão amplamente distribuídas na natureza, sendo isoladas de amostras coletadas em quase todos os ambientes onde foi procurada (Vilas Bôas, 2002). Essa variabilidade genética existente entre diferentes isolados tem sido estudada principalmente por meio da utilização de técnicas que têm como base a reação da polimerase em cadeia (PCR). Esta técnica envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase. Ela baseia-se na síntese enzimática de um fragmento específico de DNA utilizando primers (oligonucleotídeos) que se anelam nas

fitas opostas de um fragmento de DNA molde, flanqueando as regiões de interesse (Mullis & Faloona, 1987).

2.5 Marcadores baseados em PCR (Polymerase Chain Reaction)

O advento da biologia molecular tem provocado várias mudanças nos tipos de acessos utilizados para caracterização e identificação de bactérias, fungos e na pesquisa de doenças (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Diversas técnicas estão disponíveis para a detecção da variabilidade genética. Estas técnicas permitem a obtenção de um número ilimitado de marcadores moleculares cobrindo todo o genoma do organismo. Tais marcadores genéticos são utilizados para a detecção da variabilidade genética, gerando informações sobre a diversidade genética (Guimarães et al., 2006).

De acordo com Farah (1997), a técnica de PCR (Reação da Polimerase em Cadeia) foi descrita por Kary Mullis no final dos anos 80 e tem revolucionado a genética molecular, pois possibilita uma nova estratégia na análise de genes por meios de um método simples e rápido de amplificação de seqüências. A PCR explora a capacidade de duplicação do DNA, permitindo amplificar pequenos e específicos segmentos do genoma.

Para Bt esta técnica tem muitas utilidades e pode ser empregada com a finalidade de amplificar regiões conhecidas do DNA, para comparar geneticamente isolados de Bt pouco conhecidos, além de identificar genes *cry* específicos presentes em diferentes cepas de Bt, sendo possível caracterizar grande número de isolados (Barreto, 2005; Ceron et al., 1995), analisar sua distribuição ecológica (Thuler, 2007; Bravo et al., 1998) e ainda pode auxiliar na identificação de novas espécies (Lima et al., 2002).

A sorotipagem é o método, mas comumente utilizado para diferenciar grupos de Bt, mais a determinação do sorotipo nem sempre traduz a atividade inseticida de um isolado. Até o presente momento 84 sorotipos são conhecidos,

porém existem alguns problemas como a não diferenciação entre *B. thuringiensis* e *B. cereus* (Lecadet et al., 1999). Embora a sorotipagem seja uma técnica simples é realizada apenas em alguns laboratórios do mundo, em particular o Instituto Pasteur na França, onde se realiza a sorotipagem de *B. thuringiensis* (Ramirez & Ibarra 2005). Assim técnicas alternativas principalmente técnicas moleculares vem sendo utilizadas para caracterização e divergência genética de *Bacillus ssp.* (Shanghuan et al., 2001; Cherif et al., 2003; Lima et al., 2002; Ticknor et al., 2001 Thuler, 2007; Bravo et al., 1998).

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, I.L. **Identificação e Caracterização de um Gene *cry* Recombinante de *Bacillus thuringiensis* var. *Londrina***. 2006.120p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) Universidade Estadual de São Paulo, Jaboticabal.
- AGUIAR, R.W.S. **Estudo da toxicidade de proteínas (Cry) recombinantes de *Bacillus thuringiensis*, utilizando o sistema de expressão baseado e baculovírus e células de inseto**. 2007. 135p. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) – Universidade de Brasília..
- ARANTES, O.M.N.; VILAS-BOÂS, L.A.; VILAS-BÔAS, G.F.L.T. *Bacillus thuringiensis*: Estratégia no controle biológico. 2: 269-293. In: SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M.; AZEVEDO, J.L. (Org.). **Biotecnologia: avanços na agricultura e agroindústria**. Caxias do Sul: EDUSC, 2002. 463p.
- AZEVEDO, J.L. Microorganismos endofíticos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed.). **Ecologia microbiana**. Jaguariuma: EMBRAPA, 1998. p.117-137.
- AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI J.R.W.; PEREIRA, J.O.; ARAÚJO, W.L. Endophytic microorganisms: A review on insect control and recent advantages on tropical plants. **Environmental Biotechnology**, New York, v. 3, n.1, 31 p. 2000.
- BARRETO, M.R. **Prospecção e caracterização de Genes de *Bacillus thuringiensis* com potencial para controle de insetos-pragas da cultura da soja**. 2005.150p. Tese (Doutorado em Biologia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- BERLINER, E. Ueber die Schlattsucht der Mehlmottenraupe. **Z Gesamte Getreidewesenm**, London, v.25, p.3160-3162, 1911.
- BOBROWSKI, V.L.; FIÚZA, L.M.; PASQUALI, G. ; BODANESE-ZANETTINI, M.H. Genes de *Bacillus thuringiensis*: uma estratégia para conferir resistência a insetos em plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.5, p. 843 – 850, 2003.
- BOURGOUIN, C.; DELÉCLUSE, A.; RIBIER, J.; KLIER, A.; RAPOPORT, G. A *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* gene encoding a 125-kilodalton larvicidal polypeptide is associated with inverted repeat sequences. **Journal Bacteriology**, London, v.170, p.3575-3583, 1988.

BOSCH, D.; SCHIPPER, B.; KLEIJ Van Der H.; DE MAAGD, R.A.; STIEKEMA, W.J. Recombinant *Bacillus thuringiensis* crystal proteins with new properties: possibilities for resistant management. **Biotechnology**, New York, v.12, p. 915-919, 1994.

BRAVO, A.; QUINTERO, R. Importancia y potencial del *Bacillus thuringiensis* en el control de plagas. Oficina regional de la FAO para America Latina y el Caribe. **Rede de cooperation tecnica en biotecnologia vegetal (REDBIO)**. Chile, 1998. 30 p.

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

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

CHERIF, A.; BRUSETTI, L.; BORIN, S.; RIZZI, A.; BOUDABOUS, A.; KHYAMI-HORANI, H.; DAFFONCHIO, D. Genetic Relationship in the '*Bacillus cereus* group' by rep-PCR fingerprinting and sequencing of a *Bacillus anthracis*-specific rep-PCR fragment. **Journal Applied Microbiology**, Oxford, v. 94, n.6, p.1108-1119. 2003.

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D.R.; FEITELSON, J.; SCHNEPF, E.; LAMBERT, B.; ERECLUS, D.; GAWRON-BURKE, C.; DEAN, D.H. Revision of the nomenclature for *Bacillus thuringiensis cry* genes. In: **Annual meeting of the society for invertebrate pathology**, 28., Ithaca. Abstract. Ithaca: Cornell University, 1995. p.14.

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D.R.; FEITELSON, J.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; DEAN, D.H. Revision of the nomenclature of the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v.62, n.3, p. 807-813, 1998.

EDWARDS D. L.; PAYNE, J.; SOARES, G. G. Novel isolates of *Bacillus thuringiensis* having activity against nematodes. **European Patent Application**, London, p.303- 426, 1988.

- FARAH, S.B. **DNA segredos & mistérios**. São Paulo: Sarvier, 1997. 276p.
- FEILTELSON J. S.; PAYNE J.; KIM, L. *Bacillus thuringiensis* insects and beyond. **Biotechnology**, New York, v.10, n.3, p.271-275, Mar. 1992.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas. Brasília: Embrapa/Cenargen. 1998. 220p.
- GROCHULSKI P, MASSON L, BORISOVA S, PUSZTAI-CAREY M, SCHWARTZ JL, BROUSSEAU R, CYGLER M. *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. **Journal of Molecular Biology**, London, v.254, n.3, p. 447-464, Dec. 1995.
- GUTIERREZ, P.; ALZATE, O.; ORDUZ S. A Theoretical Model of the Tridimensional Structure of *Bacillus thuringiensis* subsp. medellin Cry 11Bb Toxin Deduced by Homology Modelling. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.96, n.3, p.357-364, 2001.
- GE, A.Z.; SIVAROVA, N.D.; DEAN, D.H. Location of the *Bombyx mori* specificity domain of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin protein. The **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, Washington, v.86, n.11, p.4037-4041, June 1989.
- GONZÁLES, J.M.J.; BROWN, B.S.; CARLTON, B.C. Transfer of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus*. The **Proceedings of the National Academy of Sciences**. London, v.79, p. 6951-6955, 1982.
- GUIMARÃES C.T. et al. Marcadores moleculares no melhoramento de Plantas. In: BORÉM E CAIXETA (Ed.). **Marcadores moleculares**. Viçosa, MG: UFV, 2006. 374p.
- HANNAY, C.L. Crystalline inclusions in aerobic spore-forming bacteria. **Nature London**, London, v.172, n. 4387, p.1004-1005, 1953.
- HANNAY, C.L.; FRITZ-JAMES, P.C. The protein Crystal of *Bacillus thuringiensis*. **Canada Journal Microbiology**, Ottawa, v.1, n.8, p.694-710, 1955.
- HOFTE, H.; WHITELEY, H.R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiological Reviews**, Washington, v.53, n.2, p.242-255, June 1989.

HUSZ, B. On the use of *Bacillus thuringiensis* in the fight against the corn borer. **Institute Corn Borer Investment Science Republic**, London, v.2, p.99-110, 1929.

KOGAN, M. Integrated pest management: Historical perspectives and contemporary developments. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v.43, p.243-270, 1998.

KRIEG, A.; LANGENBRUCH, G.A. Susceptibility of arthropod species to *Bacillus thuringiensis*. In: **Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980**. Edited by H.D. Burges. Academic Press, London., p. 837-896. 1981.

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

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

KUMAR ASM, ARONSON AI. Analysis of mutations in the pore-forming region essential for insecticidal activity of a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.181, n.19, p. 6103-6107, Oct. 1999.

LECADET, M.M.; FRACHON, E.; DUMANOIR, V. C.; RIPOUTEAU, H.; HAMON, S.; LAURENT, P.; THIERY, I. Updating the H-antigen classification of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of applied microbiology**. Oxford, v.86, n.4, p.660-672, Apr. 1999.

LEE MK, YOU TH, GOULD FL, DEAN DH. Identification of residues in domain III of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin that affect binding and toxicity. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.65, n.10, p. 4513-4520, Oct. 1999.

LERECLUS, D.; LECADET, M.M.; RIBIES, J.; DEDONDER, R. Molecular relationships among plasmids of *Bacillus thuringiensis*: conserved sequences through 11 crystalliferous strains. **Molecular and General Genetics**, Washington, v.186, p. 3491-398, 1982.

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

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

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

LIMA, A.S.G.; GUIDELLI, A.M.; ABREU I.L.; LEMOS, M.V.F. Identification of new isolates of *Bacillus thuringiensis* using rep-PCR products and δ -endotoxin electron microscopy. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.25, n.2, p.225-229, June 2002.

LU, H., RAJAMOHAN, F., DEAN, D.H. Identification of amino acid residues of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin CryIA(a) associated with membrane binding and toxicity to *Bombyx mori*. **Journal Bacteriology**, Washington, v.176, n.17, p.5554-5559, Sept. 1994.

MASSON, L.; MAZZA, A.; GRINGORTEN, I.; BAINES, D.; ANELIUNAS, R.; BROUSSEAU, R. Specificity domain localization of *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins is highly dependent on the bioassay system. **Molecular Microbiology**, Oxford, v.14, n. 5, p. 851-860, Dec. 1994.

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

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

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

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

MOSCARDI, F. Assessment of the application of baculoviruses for control of lepidoptera. **Annual Review Entomology**, Palo Alto, v. 44, p. 257-289, 1999.

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

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

POLANCZYK, R.; ALVES, S.B. *Bacillus thuringiensis*: uma breve revisão. **Agrociências**, Montividéu, v.7, p.1-10, 2003.

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, Mar. 2005.

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

SHANGKUAN, Y.H.; CHANG, Y.H.; YANG, J.F; LIN, H.C; SHAIQ, M.F. Molecular characterization of *Bacillus anthracis* using multiplex PCR, ERIC-PCR and RAPD. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.32, n.3, p.139-145, Mar. 2001.

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

TESTER, C.F. Influence of a genetically modified endophytic bacterium on composition and decomposition of corn residue. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 24, n. 11, p. 1107-1112, Nov. 1992.

THULER, A.M.G. *Bacillus thuringiensis*: **Diversidade genética, estrutura genética de populações de eficiência no controle de *Plutella xylostella* (L., 1758) (Lepidoptera:Plutellidae)**. 2007. 140p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal.

TICKNOR, T.O.; KOLSTO, A.B.; HILL, K.K.; KEIM, P.; LAKER, M.T.; TONKS, M.; JACKSON, P.J. Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis of Norwegian *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* Soil Isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.67, n.10, p.4863–4873, Oct. 2001.

VALADARES-INGLIS, M.C.C.; SOUZA, M.T.; SHILER, W.W. Engenharia genética de microorganismo agente de controle biológico. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed.). **Controle Biológico**. Jaguariúna: Embrapa, 1998. p. 201-230.

VALICENTE, F.H.; BARRETO, M.R.; VASCONCELOS, M.J.V.; FIGUEIREDO, J.E.F.; PAIVA, E. Identificação através de PCR dos genes *CryI* de cepas de *Bacillus thuringiensis* Berliner eficientes contra a lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v.29, n.1, p.147-153, mar. 2000.

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, Oct./Dec. 2003.

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

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

WEBER, J. A natural control of Dutch elm disease. **Nature**, London, v. 292, p. 449-451, 1981.

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

WU, D.; ARONSON, A. I. Localized mutagenesis defines regions of the *Bacillus thuringiensis* d-endotoxin involved in toxicity and specificity. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 267, p.2311–2317, Feb. 1992.

WALTERS, F. S.; SLATIN, S. L.; KULESZA, C. A. ; ENGLISH, L.H. Ion channel activity of N-terminal fragments from CryIA(c) delta-endotoxin. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, London ,v.196, n.2, p.921–926, Oct. 1993.

CAPÍTULO 2

CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL PLASMIDIAL DE *Bacillus thuringiensis*

1 RESUMO

Bacillus thuringiensis possui genes que codificam as proteínas Cry, que são encontrados em cromossomos ou em plasmídeos de diversos tamanhos (4-150 MDa). Estes plasmídeos são divididos em dois grupos, os menores que 30MDa e os maiores que 30MDa. Sendo esta diferença observada quando as amostras são aplicadas em gel de agarose. Em *B. thuringiensis* plasmídeos menores estão presentes em maiores quantidades, mais ainda não se sabe ao certo qual a específica função dos mesmos. Quanto aos mega-plasmídeos sabe-se que são abrigos dos genes *cry* e a quantidade de genes pode variar, podendo apresentar apenas um único gene ou vários em um mesmo plasmídeo. No presente trabalho foi usado um novo protocolo, mais prático e rápido na obtenção do padrão plasmidial de *B. thuringiensis*, com objetivo de caracterizar o perfil plasmidial de um grupo de cepas pertencente a Embrapa Milho e Sorgo e verificar a existência de relação desses perfis entre cepas pertencentes à mesma subespécie. Foi possível caracterizar 49 das 60 cepas utilizadas com a migração das bandas em gel de agarose. Cepas pertencentes à mesma subespécie apresentaram diferentes migrações de plasmídeos, com exceção das cepas 348L e 462A pertencentes à subespécie *galleriare*. A cepa T09 *Bt tolworthi* apresentou idêntica migração plasmidial com as duas cepas pertencentes à subespécie *galleriare* citadas à cima. Assim obteve-se 46 cepas com perfil plasmidiais distintos, fazendo desta técnica uma ferramenta útil para discriminar cepas específicas, tornando-se valiosa em termos de propriedade intelectual e reivindicações.

CHARACTERIZATION OF THE PLASMID PROFILE OF *Bacillus thuringiensis*.

2 ABSTRACT

Bacillus thuringiensis harbors genes that encode the Cry proteins, that are found on chromosomes or plasmids of various sizes (4-150 MDa). These plasmids are divided into two groups, smaller than 30MDa and larger than 30MDa. The difference being observed when samples are applied in agarose gel. In *Bacillus thuringiensis* small plasmids are present in larger quantities, their specific functions unknown. Mega-plasmids usually harbor cry genes and the number of genes may vary within each plasmid, it can harbor only a single gene or several genes in the same plasmid. In the present research a new protocol more practical and faster to achieve the standard plasmid of *B. thuringiensis*, in order to characterize the plasmid profile of a group of strains belonging to Embrapa Maize and Sorghum Research Center and verify the existence of such relationship between strains belonging to the same subspecies. It was possible to characterize 49 of the 60 strains used analyzing the migration of the bands in agarose gel. Strains belonging to the same subspecies showed different migration patterns, with exception of 348L and 462A strains belonging to subspecies *galleriare*. The strains T09 *Bt tolworthi* showed identical plasmidial migration with both strains belonging to the subspecies *galleriare* mentioned above. Distinct plasmidial profile of 46 strains were obtained, and this technique becomes a useful tool to discriminate specific strains and a valuable in terms of intellectual property and claims.

3 INTRODUÇÃO

3.1 Padrão plasmidial

Os genes que codificam as proteínas Cry encontram-se nos cromossomos ou em plasmídeos de diversos tamanhos (4-150 MDa), não somente em combinações distintas ou várias cópias dentro de um plasmídeo, mas também por combinações de plasmídios presentes nas diversas cepas de *B. thuringiensis* (Lereclus et al., 1993).

Os plasmídeos são elementos genéticos extracromossomais encontrados em várias espécies de bactérias e em algumas leveduras. As moléculas de DNA plasmidial são circulares e dupla-fita. Comparável ao cromossomo bacteriano, os plasmídeos têm a habilidade de replicação autônoma e possuem genes ativos. Adicionalmente, durante a divisão celular, observa-se a segregação de pelo menos uma cópia do plasmídeo para cada célula. Na natureza, alguns plasmídeos apresentam incompatibilidade funcional com outros plasmídeos similares, o que impede a residência simultânea na mesma célula (Birge, 1994).

Um plasmídeo padrão parece estar relacionado com cada estirpe de acordo com o sorotipo, ou qualquer outro grupo específico. Os plasmídeos padrões são divididos em dois grupos diferentes os menores que 30MDa e os maiores que 30MDa, essa diferença pode ser claramente notada quando as amostras são aplicadas em gel de agorose. Os plasmídeos menores ficam abaixo do DNA cromossomal enquanto que os chamados mega-plasmídeos ficam acima. Em bactérias Gram positivas os plasmídeos menores estão presentes em maiores quantidades, mais ainda não se sabe ao certo qual a específica função dos mesmos. Quanto aos mega-plasmídeos são abrigos dos genes *cry*, e a quantidade de genes pode variar de acordo com cada plasmídeo podendo apresentar apenas um único gene ou vários em um mesmo plasmídeo. Há

indícios de que, além do gene *cry*, esses mega-plasmídeos apresentem outros genes de grande importância (Berry et al., 2002; Chao et al., 2007; Roh et al., 2007; Loeza-Lara et al., 2005).

Em função da importância dessas moléculas nas células hospedeiras e seu uso como ferramentas moleculares, várias técnicas para a extração e purificação dos plasmídeos tem sido otimizadas (Gitahy et al., 2005).

A técnica mais utilizada é a extração por lise alcalina e purificação por ultracentrifugação em gradiente de Cloreto de Césio (Sambrook 1989) foi um dos primeiros métodos bioquímicos desenvolvidos e pode ser utilizado para obtenção de plasmídeos de vários microorganismos (Gitahy et al., 2005). Essa técnica, apesar de vários ajustes, continua sendo demorada e trabalhosa, e possui um alto nível de contaminação pela utilização do brometo de etídio. Ramirez & Ibarra (2008) desenvolveram um novo protocolo para *Bacillus thuringiensis*, mais prático e rápido na obtenção do padrão plasmidial.

O objetivo desse trabalho foi à caracterização do perfil plasmidial de um grupo de *B. thuringiensis* pertencente a Embrapa Milho e Sorgo e verificar a existência de relação do perfil plasmidial entre cepas pertencentes à mesma subespécie.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Extração de plasmídeos

Sessenta cepas de Bt foram utilizadas para caracterização molecular, dentre elas 24 são identificadas por subespécies e pertencentes às seguintes Instituições: USDA (United States Department of Agriculture), Instituto Pasteur e Embrapa Milho e Sorgo (CNPMS) de Sete Lagoas-MG. Outras 36 cepas não têm informação da subespécie e pertencem à coleção da Embrapa – CNPMS. As 24 cepas com identificação da subespécie já foram caracterizadas em relação à mortalidade da *Spodoptera frugiperda* (Valicente & Fonseca, 2004), assim como as outras 36 cepas (dados não publicados) (Tabela 1). As cepas citadas estão armazenadas em glicerol em freezer a -80°C.

A caracterização do perfil plasmidial de cepas de *B. thuringiensis* foi realizado nos laboratórios de controle biológico e biologia molecular da Embrapa Milho e Sorgo.

TABELA 1 Relação de cepas de Bt utilizadas na caracterização do perfil plasmídial, mortalidade e local de origem

Nº	Cepas do USDA	Mortalidade (%)	Local de coleta
1	HD-2 <i>Bt thuringiensis</i>	37.8*	Estados Unidos
2	HD-3 <i>Bt finitimus</i>	5.2*	Estados Unidos
3	HD-4 <i>Bt alesti</i>	6.8*	Estados Unidos
4	HD-7 <i>Bt dendrolimus</i>	5.4*	Estados Unidos
5	HD-11 <i>Bt aizawai</i>	7.8*	Estados Unidos
6	HD-12 <i>Bt morrisoni</i>	28*	Estados Unidos
7	HD-29 <i>Bt galleriare</i>	12.8*	Estados Unidos
8	HD-73 <i>Bt kurstaki</i>	2.7*	Estados Unidos
Cepas do Instituto Pasteur			
9	T-07 <i>Bt aizawai</i>	80.8*	França
10	T-09 <i>Bt tolworthi</i>	95.8*	França
11	T-06 <i>Bt entomocidus</i>	9.8*	França
12	T-24 <i>Bt neoleonensis</i>	17.9*	França
13	T-27 <i>Bt mexicanensis</i>	17*	França
14	T-23 <i>Bt japonensis</i>	33.5*	França
15	T-10 <i>Bt darmstadiensis</i>	77.9*	França
16	T-16 <i>Bt indiana</i>	12.2*	França
Cepas da Embrapa Milho e Sorgo			
17	344 – <i>Bt tolworthi</i>	100	Foz do Iguaçu - PR
18	426 – <i>Bt tolworthi</i>		Araripe - CE
19	474 – <i>Bt galleriae</i>	30	Desconhecido
20	348B – <i>Bt alesti</i>		Desconhecido
21	348L – <i>Bt galleriae</i>		Desconhecido
22	460 – <i>Bt darmstadiensis</i>	100	Melissa - PR
23	461A – <i>Bt tolworthi</i>	100	Paraná
24	462A – <i>Bt galleriae</i>	100	Paraná

...continua....

“TABELA 1, Cont.”

Nº	Cepas com eficiência 100%	Mortalidade (%)	Local de coleta
25	S460	100	Desconhecido
26	BTLM	100	Desconhecido
27	566BLR	100	Desconhecido
28	701A	100	Assis - SP
29	701B	100	Assis - SP
30	1119C	100	Santa Helena – GO
31	1124E	100	Rio Verde – GO
32	1131A	100	Jataí – GO
33	1131C	100	Jataí – GO
34	1132A	100	Rio Verde – GO
35	1132C	100	Rio Verde – GO
36	1138G	100	Jataí – GO
37	1109N	100	Rio Verde – GO
38	1145B	100	Rio Verde – GO
39	1145C	100	Rio Verde – GO
40	1148F	100	Jataí – GO
41	1132E	100	Rio Verde – GO
42	1135B	100	Rio Verde – GO
43	1136B	100	Santa Helena – GO
44	1139K	100	Rio Verde – GO
45	1354	100	Desconhecido
46	1355	100	Desconhecido
47	1357E	100	Desconhecido
48	1603B	100	Santa Catarina
49	1641	100	Londrina - PR
50	1644	100	Rolândia - PR
	Cepas com eficiência 0%		
51	376B	0	Pena Forte - CE
52	436	0	Caruaru - PE
53	257	0	Goiânia - GO
54	844K	0	Boa Esperança - MG
55	1097	0	Guapé - MG
56	1096A	0	Guapé - MG
57	1425B	0	Caruaru - PE
58	1431B	0	Simões Dias - SE
59	1540A	0	Caruaru - PE
60	1530A	0	Desconhecido

* Percentual de mortalidade descrito por Valicente e Fonseca, 2004. Os demais são Informação cedida pelo laboratório de controle biológico, Embrapa Milho e Sorgo.

Todas as cepas foram submetidas à extração plasmidial de acordo com Ramírez & Ibarra (2008), com algumas modificações. Dois meios de cultura foram testados quanto à eficiência e qualidade da técnica, para isso quatro cepas da coleção foram selecionadas e plaqueadas em meio LB sólido, mantidas durante aproximadamente 16 horas aos 28°C. Após verificar o crescimento das colônias, uma pequena amostra de cada cepa foi inoculada em 50 mL dos seguintes meios:

Meio de cultura Spizizen broth: 0,2% NH₄SO₄; 1,4% K₂HPO₄; 0,6% KH₂PO₄; 0,1% Citrato de Sódio; 0,02% MgSO₄.7H₂O, suplementado com 0,5% glicose, 0,1% Ácido Casamino e 0,01% extrato de levedura.

Meio de cultura LB saís (Lurian Bertani): 0,1% Glicose; 0,8% Caldo nutritivo; 0,5% extrato de levedura; 0,03% MgSO₄.7H₂O; 1% triptona; 0,002% FeSO₄; 0,002% ZnSO₄; 0,002% MnSO₄, e 0,5% de NaCl.

As amostras foram colocadas sob agitação de 250 rpm à 28 °C durante aproximadamente 16 horas. Após o período de crescimento, foi verificada a densidade óptica de cada amostra a 600nm. As amostras foram centrifugadas (Sorvall® Super T21) a 4°C por 15 minutos a 13.020 rpm. O pellet foi ressuspendido em 20 mL de tampão TES (30mM Tris base; 5mM EDTA; 50 mM NaCl; pH 8,0) seguido de centrifugação nas mesmas condições acima.

Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspendido em 2 mL de tampão de lise (tampão TES, 20% sacarose, 2 mg/mL lisozima e 1 µL/mL de RNase na concentração de 10 mg/mL) e incubado em banho-maria a 37 °C por 90 minutos. Após o banho-maria foi adicionada em cada amostra 3 mL de SDS 10% (Sodium Dodecyl Sulfate) e incubado a 65°C por 15 minutos. Em seguida, 1,5 mL de acetato de sódio 3M

(pH 4.8) foram adicionados às amostras, que foram incubadas à -20°C por 30 minutos. As amostras foram centrifugadas a 4°C, por 20 minutos a 13.020 rpm. Foram adicionados a esta suspensão 12 mL de etanol absoluto sendo incubado overnight à -20°C seguido de centrifugação por 20 minutos nas mesmas condições. Os pellets formados foram diluídos em 100 µL de TE (Tris-EDTA pH 8,0) e armazenados à -20 °C.

4.2 Eletroforese

Para visualização do perfil plasmidial, 10 µL de cada amostra foram aplicados em gel de agarose 0,5% em cuba horizontal. O tampão TAE (0,001M EDTA pH 8,0; 0,04M TRIS pH 8,0; 0,02M ácido acético) foi utilizado tanto para confecção do gel quanto para corrida que durou aproximadamente 4 horas a 100V. Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (1µg/ml) por aproximadamente 15 minutos e descorado em água aproximadamente 30 minutos, sendo visualizado sob luz ultravioleta e as imagens captadas pelo fotodocumentador Gel Logic 200 Imaging System.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quando se trabalha em escala, o meio de cultura para fermentação é geralmente preparado usando um dos meios padronizados pelos grandes laboratórios, para isolar microorganismos ou promover crescimento de bactéria. No laboratório de controle biológico da Embrapa Milho e Sorgo o meio de cultura (líquido ou sólido) padronizado para obtenção do crescimento de Bt é o LB (Lurian Bertani) enriquecido com sais. Baseado nesse critério o meio LB sais foi utilizado nesse trabalho.

A quantidade de fontes de nutrientes necessária foi melhor no meio LB que proporcionou um crescimento maior das cepas, essa diferença pode ser verificada com a leitura da OD (Tabela 2).

TABELA 2 Valor da densidade óptica, com diferentes meios de cultura

CEPAS BT	OD_{600nm} MEIO LURIAN BERTANI SAIS	OD_{600nm} MEIO SPIZIZEN BROTH
344	2,13	1,93
1644	2,15	1,98
T09	2,18	1,92
HD73	2,12	1,00

Já é de conhecimento geral que os micro-organismos necessitam de minerais para seu crescimento e para a formação de produtos metabólicos. Para o crescimento de Bt há a necessidade de altos níveis de carbono (glicose), nitrogênio (ácido casamino e extrato de levedura) e oxigênio (Lima, 2001).

Segundo İçgen et al. (2002) e Lacadet et al. (1980), os sais proporcionam formação do cristal protéico e tamponamento do meio o que também auxilia no crescimento dessa bactéria.

No gel de agarose é possível visualizar a qualidade do perfil plasmidial (Figura 1). Os isolados que foram cultivados em meio LB enriquecido com sais apresentaram bandas mais espessas, o que dificultou a contagem do número de plasmídeos. Já as amostras cultivadas em meio SB resultaram em um perfil mais fácil de ser avaliado, sendo possível a contagem dos mesmos. A amostra T09 extraída com o meio SB apresentou um mega-plasmídeo, enquanto a mesma amostra extraída com o meio LB acrescido de sais não foi possível à visualização do mesmo. Baseado nesse resultado o meio SB (Ramirez & Ibarra, 2008) foi o meio selecionado para extração das demais cepas.

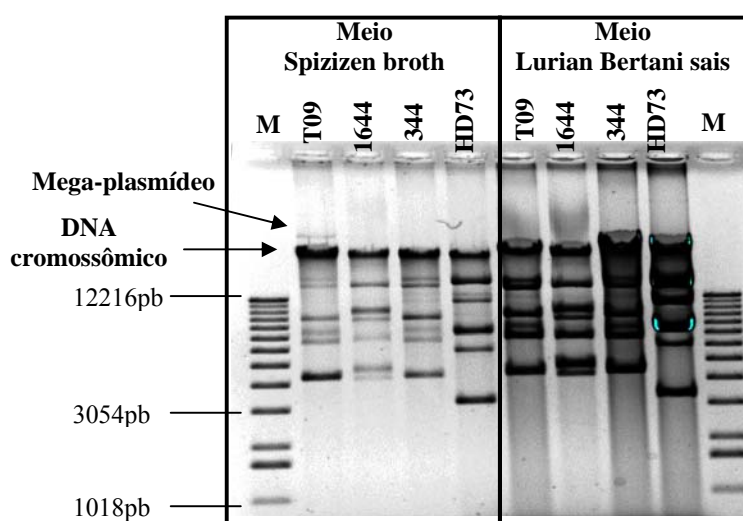


FIGURA 1 Perfil plasmidial em gel de agarose 0,5% e a qualidade visual apresentada pelos meios de cultura SB e LB sais. M (Marcador molecular 1 Kb Invitrogen)

Das 60 cepas utilizadas nessa caracterização, apenas uma não apresentou banda de DNA cromossômico ou de plasmídeos (1109N). As cepas apresentaram densidade óptica entre 1,00 a 2,39 (Tabela 3) quando considerado um comprimento de onda de 600nm (valor proporcional a densidade de células). O número de plasmídeos variou de 0 a 12 para cada cepa. Os mega-plasmídeos (acima da banda do DNA cromossômico) foram usados como uma segunda opção, pelo fato da migração no gel de agarose durante eletroforese ser muito limitada e, conseqüentemente, maior dificuldade de discriminação das bandas. Por isso a comparação incidiu apenas sobre os plasmídeos que migraram abaixo da banda do DNA cromossômico.

O padrão plasmidial foi, em geral, único para cada cepa (Figuras 1 a 4). Algumas delas, pertencentes à mesma subespécie, apresentaram padrões semelhantes, como é o caso das cepas T09 (Instituto Pasteur) (Figura 1), 344, 426 e 461A (Embapa Milho e Sorgo) (Figura 2C) pertencentes à subespécie *tolworthi*; as cepas T9 e 426 apresentaram seis plasmídeos entre 4.361 a 23.000pb, contudo ainda foi possível diferenciá-las devido a presença de um mega-plasmídeo na cepa T09 e um plasmídeo a mais na 426 com aproximadamente 2.500 pb. A cepa 344 apresentou migração semelhante de alguns plasmídeos, mas diferenciou das demais cepas, com a presença de dois plasmídeos a mais. A cepa 461A também apresentou migração diferente com presença de apenas dois plasmídios. Dessa forma todos os integrantes da subespécie *tolworthi* apresentaram perfil plasmídial único para cada cepa, podendo assim ser discriminadas.

TABELA 3 Cepas de *Bacillus thuringiensis* com seus respectivos valores de densidade óptica após 16 horas de crescimento em meio de cultura SB

Nº	Cepas	OD _{600NM}	Nº	Cepas	OD _{600NM}
1	HD-2 <i>Bt thuringiensis</i>	1,93	31	1124E	1,56
2	HD-3 <i>Bt finitimus</i>	1,64	32	1131A	2,01
3	HD-4 <i>Bt alesti</i>	1,99	33	11321C	2,04
4	HD-7 <i>Bt dendrolimus</i>	2,12	34	1132A	2,31
5	HD-11 <i>Bt aizawai</i>	1,68	35	1132C	2,00
6	HD-12 <i>Bt morrisoni</i>	2,03	36	1138G	2,00
7	HD-29 <i>Bt galleriare</i>	1,98	37	1109N	1,96
8	HD-73 <i>Bt kurstaki</i>	1,00	38	1145B	2,37
9	T-07 <i>Bt aizawai</i>	1,36	39	1145C	1,79
10	T-09 <i>Bt tolworthi</i>	1,92	40	1148F	2,05
11	T-06 <i>Bt entomocidus</i>	1,59	41	1132E	1,69
12	T-24 <i>Bt neoleonensis</i>	1,21	42	1135B	2,06
13	T-27 <i>Bt mexicanensis</i>	1,26	43	1136B	2,15
14	T-23 <i>Bt japonensis</i>	2,15	44	1139K	2,39
15	T-10 <i>Bt darmstadiensis</i>	1,94	45	1354	2,00
16	T-16 <i>Bt indiana</i>	1,30	46	1355	2,30
17	344 <i>Bt tolworthi</i>	1,93	47	1357E	1,76
18	426 <i>Bt tolworthi</i>	2,17	48	1603B	2,18
19	474 <i>Bt galleriae</i>	2,04	49	1641	1,87
20	348B <i>Bt alesti</i>	1,73	50	1644	1,98
21	348L <i>Bt galleriae</i>	2,12	51	376	1,98
22	460 <i>Bt darmstadiensis</i>	1,30	52	436	2,21
23	461A <i>Bt tolworthi</i>	1,26	53	244	1,80
24	462A <i>Bt galleriae</i>	2,14	54	844K	2,18
25	S460	2,27	55	1097	2,07
26	BT LM	1,92	56	1096A	1,45
27	566BLR	2,13	57	1425B	2,00
28	701A	2,32	58	1431B	2,21
29	701B	2,29	59	1540A	2,23
30	1119C	1,65	60	1530A	2,20

As cepas 348L e 462A (Figura 2C) pertencentes à subespécie *galleriare*, apresentaram semelhança na migração das bandas. Elas possuem seis plasmídeos entre 4.361 a 23.000pb e um mega-plasmídeo em cada, não havendo diferenças entre elas. Já a cepa HD29 (Figura 2C) apresenta três plasmídeos sendo que os mesmo coincidem com os das cepas 348L e 462A. A cepa 474

apresentou mega-plasmídeos assim como cepas 348L e 462A. Esta diferença na migração entre cepas pertencentes à mesma subespécie também foi detectado por Ramirez e Ibarra (2008) com cepas pertencentes à subespécie *israelensis*, *thuringiensis* e *kurstaki*.

Curiosamente a migração dos plasmídeos presente nas cepas T09, 348L e 462A foi idêntica, como pode ser observado na Figura 2C, e pertencem a diferentes subespécies. Apesar dos plasmídeos apresentarem o mesmo tamanho, a sequência de DNA pode ser diferente, o que deve ser levado em consideração em trabalhos futuros.

Migrações plasmidiais semelhantes e até idênticas foram encontradas dentro e entre subespécies. Apesar de serem de subespécies diferentes podem ter evoluído de um único ancestral em comum. Algumas cepas apresentaram poucos plasmídeos em comum apesar de serem da mesma subespécie. Isso se deve ao fato de *Bacillus thuringiensis* ser capaz de perder plasmídeos ao longo da evolução. As demais cepas podem ter evoluído de ancestrais diferentes explicando essa divergência encontrada no perfil plasmidial (Aptosoglou et al., 1997; Lereclus et al., 1982).

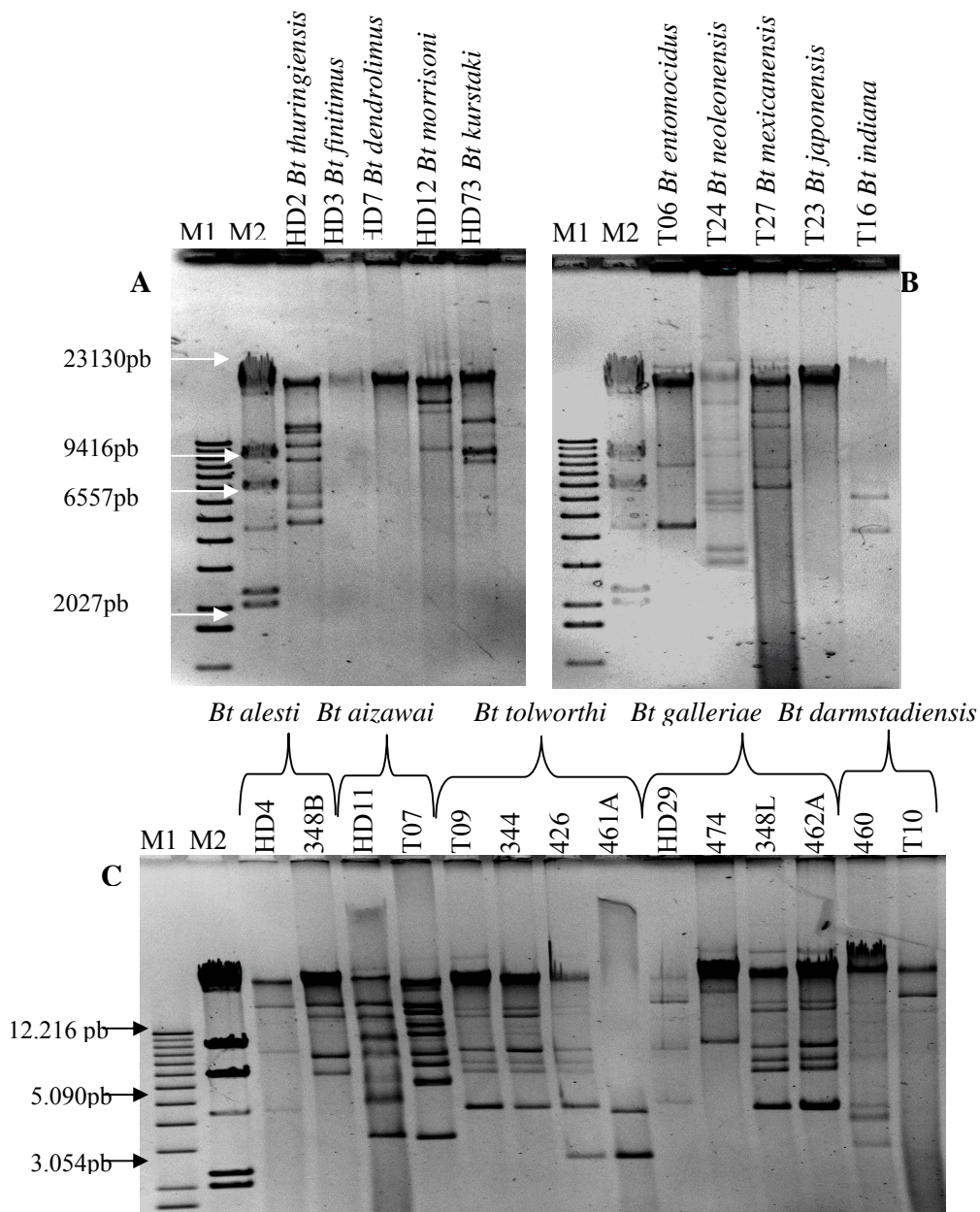


FIGURA 2 Padrão plasmidial de *Bacillus thuringiensis* em gel de agarose 0,5%.
 M1: Marcador 1Kb, M2: Marcador λ DNA Hind III

Entre as cepas com eficiência de 100% para *Spodoptera frugiperda*, a cepa 1641 foi a que apresentou o maior número de plasmídeos, com um total de 12 plasmídeos variando os tamanhos entre 1.636 e aproximadamente 23.000 pares de bases (Figura 3A). Esse grupo em geral apresentou grande diversidade, ou seja, um perfil único para cada cepa (Figura 3). Duas cepas apresentaram apenas DNA cromossômico (701B e 1132E), as demais apresentaram um ou mais plasmídeo, sendo a cepa 1355 a única desse grupo que apresentou mega-plasmídeo.

Das dez cepas pertencentes ao grupo com 0% de eficiência para o controle de *S. frugiperda*, cinco cepas apresentaram apenas DNA cromossômico (376B; 257; 844K; 1425B e 1540A) e outras cinco apresentaram de um a quatro plasmídeo (Figura 4). As cepas que apresentaram apenas DNA cromossômico podem ter apenas mega-plasmídeos que não foram visualizados devido à difícil migração em gel de agarose. Ramirez e Ibarra (2008) identificaram um grupo de oito cepas que apresentam apenas mega-plasmídeos tornando impossível a diferenciação entre elas.

Com exceção das cepas T09, 348L e 462A, que apresentaram a mesma migração dos plasmídeos e as cepas que apresentaram apenas DNA cromossômico, todas as cepas apresentaram perfil plasmidial distintos.

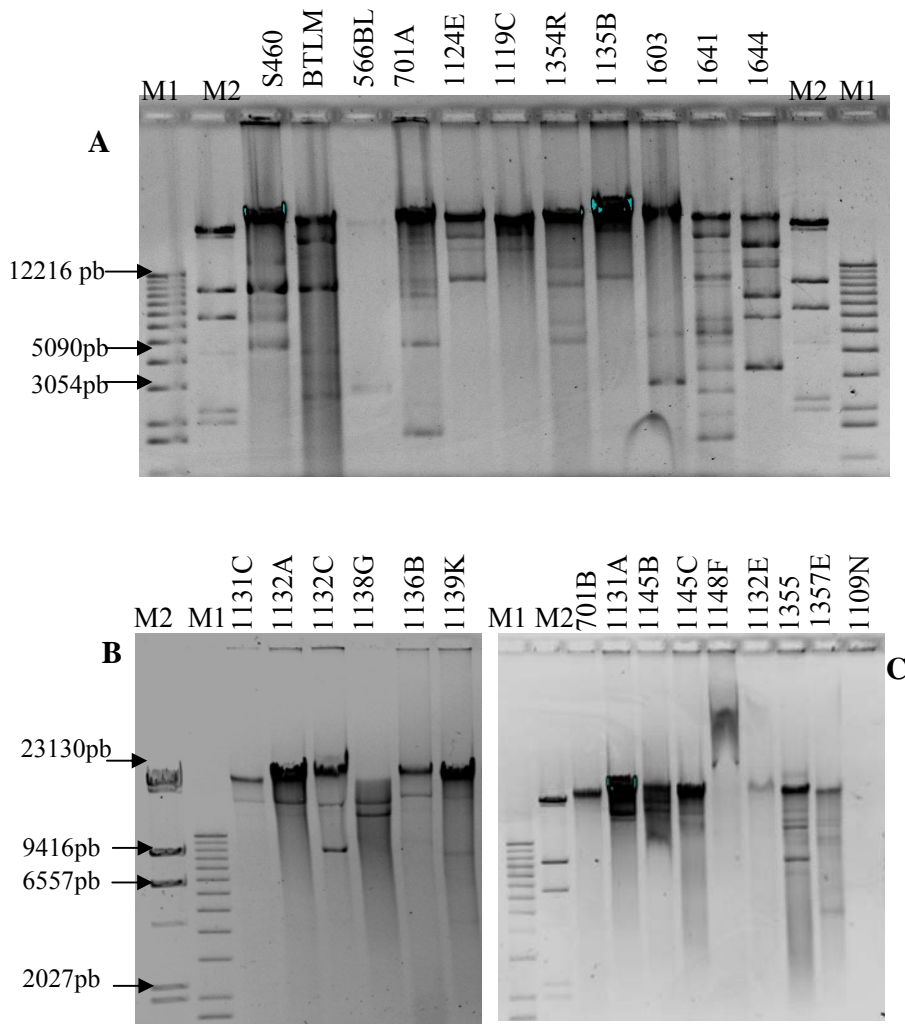


FIGURA 3 Padrão plasmidial de *Bacillus thuringiensis* em gel de agarose 0,5%.
M1: Marcador 1Kb, M2: Marcador λ DNA Hind III

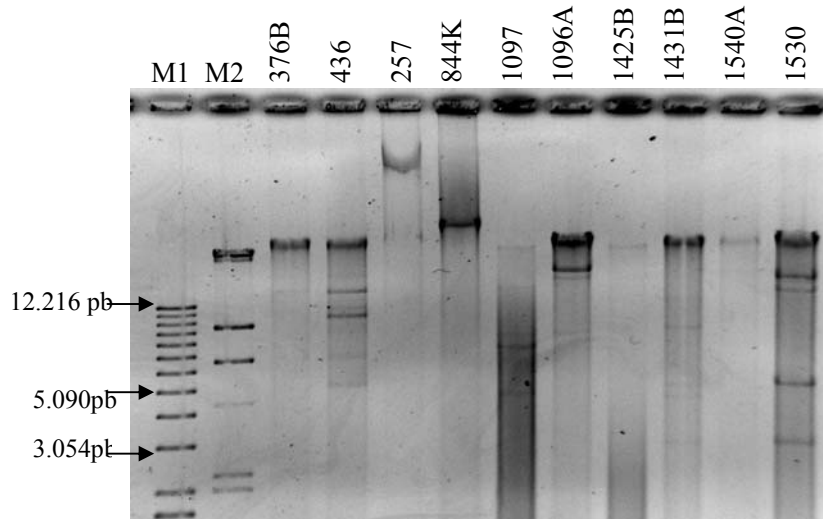


FIGURA 4 Padrão plasmidial de *Bacillus thuringiensis* em gel de agarose 0,5%.
M1: Marcador 1Kb, M2: Marcador λ DNA Hind III

Os trabalhos com plasmídeos de *B. thuringiensis* tiveram maior avanço no final dos anos 70 quando levantaram a hipótese de os plasmídeos estarem relacionados com a formação de cristais (González & Carlton, 1980). Depois a atenção voltou-se para a localização dos genes *cry* em plasmídeos e a capacidade de transferência de plasmídeos entre *B. thuringiensis* e *B. cereus* (Hu et al., 2004; Jesen et al., 1995; Kronstad et al., 1983). Estes e outros trabalhos envolvendo plasmídeos já foram publicados, mais poucos relatam à importância do perfil plasmidial na caracterização de cepas de Bt.

A presença de mega-plasmídeos nesse grupo de sessenta cepas foi menor em relação ao trabalho de Ramirez & Ibarra (2008). Eles conseguiram isolar mega-plasmídeos da maioria das cepas, mas de forma similar a estes, mega-plasmídeos foram utilizados apenas em caráter discriminatório, sendo utilizado apenas para diferenciar a cepa T09 da cepa 426, presente na subespécie. Além disso, mega-plasmídeos são facilmente degradados durante o armazenamento,

perdendo a informação sobre cada perfil, enquanto que os demais plasmídeos, se armazenados em boas condições, podem ser visualizados em gel de agarose, com um satisfatório nível de segurança e reprodutibilidade.

No trabalho de Ramirez & Ibarra (2008), as maiores preocupações foram sobre a reprodutibilidade e a viabilidade da técnica usada para isolar os plasmídeos, que foi comprovado neste trabalho.

Migrações plasmidiais semelhantes e até idênticas foram encontradas dentro e entre subespécies, isso reforça os relatos de Ramirez & Ibarra (2008) que essa ferramenta é útil pra diferenciar cepa específicas, algo altamente valioso em reivindicações de propriedade intelectual.

6 CONCLUSÕES

Cepas pertencentes à mesma subespécie podem apresentar diferentes migrações plasmidiais, enquanto cepas pertencentes a subespécies diferentes apresentaram migrações plasmidiais semelhantes e até idênticas.

Com a caracterização distinta obtida pelo perfil plasmídial, se torna difícil a construção de dados binários e posteriores análises de agrupamentos.

Esta técnica pode ser utilizada para discriminar cepas específicas, tornando-se uma ferramenta valiosa em termos de propriedade intelectual e reivindicações.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APTOSOGLOU, S.G.; SIVROPOULOU, A.; KOLIAIS, S.I. Plasmid patterns of *Bacillus thuringiensis* strains and isolates. **Microbios**, Cambridge, v.91, p.203-214, 1997.

BIRGE, E. A. Bacterial and Bacteriophage Genetics. New York: Springer-Verlag, 1994. 45 p.

BERRY, C.; O'NEIL, S. BEN-DOV, E. JONES, A.F.; MURPHY, L.; QUAIL, M. A.; HOLDEN, M.T.G.; HARRIS, D.; ZARITSKY, A.; PARKHILL, J. Complete sequence and organization of pBtoxis, the toxin-coding plasmid of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **Applied And Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n.10, p. 5082-5095, Oct. 2002.

GITAHY, P.M.; LIMA, G.M.S.; ARAÚJO, J.L.S.; SOUZA, M.T.; BALDANI, J.I. **Purificação de DNA plasmidial de *Bacillus thuringiensis* por ultracentrifugação em gradiente de cloreto de céσιο**. Seropédia: Embrapa Agrobiologia, 2005. 20 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento Agrobiologia, 8).

GONZÁLEZ, J. M., JR.; CARLTON, B.C. Patterns of plasmid DNA in crystalliferous and acrySTALLIFEROUS strains of *Bacillus thuringiensis*. **Plasmid**, San Diego, v.3, n.1, p.92-98, 1980.

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

IÇGEN, Y.; IÇGEN, B.; OZCENGİZ, G. Regulation of crystal protein biosynthesis by *Bacillus thuringiensis*: II. Effects of carbon and nitrogen sources. **Research in Microbiology**, Paris, v.153, n.9, p.605-609, Nov. 2002.

JENSEN, G.B.; WILCKES, A.; PETERSEN, S.S.; DAMGAARD, J.; BAUM, J.A.; ANDRUP, L. The genetic basis of the aggregation system in *Bacillus* pX016. **Journal Bacteriology**, Washington, v.177, n.10, p.2914-2917, May 1995.

KRONSTAD, J.; SCHNEPF, W.H.E.; WHITELEY, H.R. diversity of locations for *Bacillus thuringiensis* crystal protein genes. **Journal of Bacteriology**, Oxford, v.154, n.1, p.419-428, Jan. 1983

LECADET, M.M.; BLONDEL, O.; RIBIER, J. A semi-defined medium for growth and sporulation in *Bacillus thuringiensis* Berliner and many other strains. **Journal of General Microbiology**, v.121, n.11, p.203-212, Nov. 1980.

LERECLUS, D.; LECADET, M.M.; RIBIER, J.; DEDONDER, R. Molecular relationships among plasmid of *Bacillus thuringiensis*: conserved sequences through 11 crystalliferous strains. **Molecular General Genetics**, Washington, v.186, p.391-398, 1982

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

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biociencia industrial**. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. v.3, p.593.

LOEZA-LARA, P.D.; BENINTENDE, G.; COZZO, J. OCHOA-ZARZOSA, A.; BAIZABAL-ZGUIRRE, V.M.; VALDE-ALARCÓN, J.J.; LÓPEZ-MEZA, R. The plasmid pBMBt1 from *Bacillus thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* (INTA Mo14-4) replicates by the Rolling-circle mechanism and encodes a novel insecticidal crystal protein-like gene. **Plasmid**, v.54, p.229-240, 2005.

RAMÍREZ, R.; IBARRA, J. Plasmid patterns of *Bacillus thuringiensis* type strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.74, n.1, p.125-129, Jan. 2008.

ROH, J.Y.; CHOI, J.Y.; LI, M.S.; JIN, B.R.; HOJE, Y. *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and effective tool for insect pest control. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Seoul, v.17, n.4, p.547-559, Apr. 2007.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**, 2nd ed. Cold spring harbor laboratory press, cold spring harbor, NY, 1989.

VALICENTE, F.H; FONSECA, M.M. Susceptibilidade da lagarta-do-cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda*, a Diferentes isolados de *Bacillus thuringiensis*. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v.3, n.1, p.21-29, 2004

CAPÍTULO 3

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Bacillus thuringiensis* UTILIZANDO REP-PCR (Repetitive Element Polymorphism)

1 RESUMO

Os elementos de sequências repetitivas de DNA têm sido amplamente estudados em organismos procariotos. Estas sequências são altamente conservadas e, se apresentam em múltiplas cópias no genoma da maioria das bactérias Gram-negativas e em várias Gram-positivas, podendo ser utilizada para produzir “fingerprints”. A caracterização através de sequências repetitivas e conservadas nos genomas bacterianos, principalmente das sequências REP (Repetitive Extragenic Palindromic) e ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus), tem sido realizada por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), o que originou a ferramenta chamada REP-PCR (Repetitive Element Polymorphism). O uso desta ferramenta tem a vantagem de os primers possuírem sequências conhecidas e já foram utilizados em estudos com várias bactérias. Assim, o presente trabalho teve como objetivo verificar a divergência genética entre 56 cepas de *Bacillus thuringiensis* com base nas sequências ERIC e REP, seu agrupamento e possíveis relações destes grupos entre subespécies e mortalidade. Os fragmentos gerados foram analisados por eletroforese em géis de agarose ou poliacrilamida, dependendo do primer usado. As distâncias genéticas foram obtidas pelo complemento do coeficiente de Jaccard e os agrupamentos foram realizados pelo método UPGMA com aplicação de bootstrap para verificar a consistências dos agrupamentos. Uma segunda análise foi realizada pelo método de Tocher. Os dendrogramas gerados pelos primers ERIC e Bc-REP não foram muito informativos quando avaliados separadamente, já com a análise em conjunto, detectou grande divergência genética entre as 56 cepas de *B.thuringiensis* com formação de 21 grupos quando considerada uma distância de 60% como ponto de corte. Entre estes grupos, houve valores de bootstrap acima de 50% considerados consistentes também houve grupos menos consistentes ($\leq 50\%$) que está relacionada com o menor número de bandas obtidas para avaliação. Essa baixa consistência pode estar relacionada com número de bandas, que foram menores nestes casos. A maioria dos grupos formados com o método Tocher apresentou homologia com os grupos obtidos

com o UPGMA e a formação dos grupos parece estar relacionada com mortalidade e procedência, necessitando mais estudos para confirmação.

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *Bacillus thuringiensis* USING REP-PCR (Repetitive Element Polymorphism).

2 ABSTRACT

The elements of repetitive DNA sequences have been widely studied in prokaryotes, are highly conserved and it is present in multiple copies in the genome of most Gram-negative bacteria and several Gram-positive and can be used to produce "fingerprints" in different organisms. The characterization through the repetitive and conserved sequences in bacterial genomes, especially sequences of REP (Repetitive Extragenic Palindromic) and ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) have been performed by polymerase chain reaction (PCR), which led to the tool called REP-PCR (Repetitive Element Polymorphism). The use of this tool has the advantage that the primer sequences are known and have been used in studies with various bacteria. Thus this study aimed to determine the genetic divergence among 56 strains of *Bacillus thuringiensis* based on the ERIC and REP sequences, identifying whether there is formation of groups and whether these are related subspecies and efficiency of mortality. The fragments generated were analyzed by electrophoresis in agarose gel or polyacrylamide depends on primer used. The genetic distances obtained by Jaccard coefficient and the groups were done by method UPGM with bootstrap application to verify the consistence of the groups. A second group analysis was done using Tocher method. The dendrograms generated by primers ERIC and Bc-REP were not very informative when evaluated separately, however with the analysis, detected high genetic divergence among the 56 strains of *B. thuringiensis* with 21 groups being formed when considering a distance of 60%. Analyzing these 21 groups has been appearing bootstrap values higher than 50% and groups less consistent ($\leq 50\%$) seem to be related to the bands that were smaller in this case. Some groups formed with Tocher method presented homology with the obtained groups by UPGMA and with these analysis can be related with mortality and origin, requiring further study to confirm.

3 INTRODUÇÃO

3.1 O uso de seqüências de DNA repetitivo em análises genéticas

Os elementos de seqüências repetitivas de DNA conhecido como rep-PCR (Repetitive Element Polymorphism) têm sido amplamente estudados em organismos procariotos (Versalovic et al., 1991), tem-se mostrado extremamente confiáveis, reproduzíveis, simples e de rápida realização e altamente discriminatória, mesmo entre populações de uma mesma espécie (Versalovic et al., 1994; Louws et al., 1999; Rademaker & De Bruijin, 1997).

Rep-PCR utiliza primers que são complementares às seqüências repetitivas no DNA, altamente conservadas, que se apresentam em múltiplas cópias no genoma da maioria das bactérias Gram-negativas e em várias Gram-positivas, podendo desta forma ser utilizado para produzir “fingerprints” em diversos organismos (Versalovic et al., 1994). O uso desses primers leva à amplificação seletiva de regiões genômicas distintas localizadas entre as regiões repetitivas, o que gera padrões e bandas referentes às regiões entre esses elementos repetitivos (Rademaker & De Bruijin, 1997).

As seqüências REP (Repetitive Extragenic Palindromic), descobertas em *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli* (Higgins et al., 1982), foram identificadas através de comparações das seqüências de DNA das regiões intercistrônicas de diferentes operons (Gilson et al., 1984; Higgins et al., 1982). Elas são formadas por uma seqüência conservada de 35-40pb, constituindo um palíndromo.

Novas seqüências repetitivas de DNA identificadas como seqüências ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) foram descritas em vários membros da família *Enterobacteriaceae*, inclusive *E. coli* e *S. typhimurium* (Sharples & Lloyd, 1990). Estas seqüências também foram

identificadas em regiões intergênicas dentro e entre operons, muito semelhante às sequências REP. Contudo, as sequências ERIC apresentam algumas diferenças em relação às sequências REP, sendo compostas por uma maior quantidade de pares de bases (124-127) e não restritas apenas às regiões transcritas dos genes (Stern et al., 1984; Sharples & Lloyd, 1990; Versalovic et al., 1991; Shuhaimi et al., 2001). As sequências ERIC estão localizadas em regiões transcritas e não codificadoras do cromossomo. Frequentemente são localizadas entre genes em operons com a posição variando em relação ao promotor ou terminador nas diferentes repetições (Sharples & Lloyd, 1990).

A função das sequências ERIC ainda não foi completamente esclarecida, mas devido à frequente localização dentro de grandes operons multigênicos, é possível que estas sequências estejam regulando a expressão de genes associados (Sharples & Lloyd, 1990).

Versalovic et al. (1991) delinearão pares de sequências iniciadoras correspondentes às sequências palindrômicas ERIC e REP. Devido à conservação destas sequências, a orientação dos iniciadores em sentido oposto ao centro da sequência, amplificando as regiões entre duas repetições, o que permite a obtenção de padrões específicos para espécies e linhagens bacterianas.

A caracterização de sequências repetitivas e conservadas nos genomas bacterianos, principalmente das sequências REP e ERIC, tem sido realizada por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), o que originou a ferramenta chamada rep-PCR (Repetitive Element Polymorphism) (Versalovic et al., 1991).

O uso de rep-PCR tem a vantagem de que os primers possuem sequências conhecidas e já foram utilizados em estudos com várias bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Desta forma não é necessário o conhecimento prévio da estrutura genômica de uma determinada espécie e dispensa uma seleção inicial de primers, e com isso, gera resultados em um período menor de tempo (Shangkuan et al., 2001; Lima, 2002).

Dentro do gênero *Bacillus*, que é composto por uma grande diversidade de espécies, muitos trabalhos já foram realizados com a utilização desta técnica para diversas finalidades a exemplo da caracterização de linhagens de *B. cereus* e *B. anthracis* (Shangkuan et al., 2000), relação genética entre grupos de *B. cereus* e *B. anthracis* (Cherif et al., 2003), caracterização molecular de *B. anthracis* (Shangkuan et al., 2001), relação genética entre populações de *B. cereus* e *B. thuringiensis* (Peruca et al., 2008) entre outros.

Lima et al. (2002) utilizaram a técnica de PCR e sequências repetitivas ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) e REP (Repetitive Extragenic Palindromic) para analisar a similaridade genética entre 56 subespécies de Bt e 95 isolados, e juntamente com análises de características morfológicas, chegaram a conclusão que dois isolados nativos possam ser duas novas subespécie de *B. thuringiensis*.

Assim, o presente trabalho teve como objetivo verificar a divergência genética de 56 cepas de *Bacillus thuringiensis* com base nas sequências ERIC e REP, identificando possíveis agrupamentos e relacionando com subespécies e eficiência de mortalidade.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Cinquenta e seis cepas de Bt foram utilizadas para caracterização molecular, dentre elas 24 são cepas previamente identificadas por subespécies e pertencentes às seguintes Instituições: USDA (United States Department of Agriculture), Instituto Pasteur, e Embrapa Milho e Sorgo (CNPMS) de Sete Lagoas-MG. Outras 32 cepas não têm informação da subespécie e pertencem à coleção da Embrapa – CNPMS. As 24 cepas com identificação da subespécie foram previamente testadas em larvas de *S. frugiperda* (Valicente & Fonseca, 2004), assim como as outras 32 cepas (dados não publicados) (Tabela 1). As cepas citadas estavam armazenadas no glicerol em freezer (-80°C).

Este experimento de divergência genética com ERIC e REP foi realizado no laboratório de biologia molecular da Embrapa Milho e Sorgo.

TABELA 1 Relação de cepas de Bt utilizadas na caracterização molecular, com percentual de eficiência na mortalidade da *S. frugiperda* e procedência

Nº	Cepas do USDA	Mortalidade (%)	Local de coleta
1	HD-2 <i>Bt thuringiensis</i>	37.8*	Estados Unidos
2	HD-3 <i>Bt finitimus</i>	5.2*	Estados Unidos
3	HD-4 <i>Bt alesti</i>	6.8*	Estados Unidos
4	HD-7 <i>Bt dendrolimus</i>	5.4*	Estados Unidos
5	HD-11 <i>Bt aizawai</i>	7.8*	Estados Unidos
6	HD-12 <i>Bt morrisoni</i>	28*	Estados Unidos
7	HD-29 <i>Bt galleriare</i>	12.8*	Estados Unidos
8	HD-73 <i>Bt kurstaki</i>	2.7*	Estados Unidos
Cepas do Instituto Pasteur			
9	T-07 <i>Bt aizawai</i>	80.8*	França
10	T-09 <i>Bt tolworthi</i>	95.8*	França
11	T-06 <i>Bt entomocidus</i>	9.8*	França
12	T-24 <i>Bt neoleonensis</i>	17.9*	França
13	T-27 <i>Bt mexicanensis</i>	17*	França
14	T-23 <i>Bt japonensis</i>	33.5*	França
15	T-10 <i>Bt darmstadiensis</i>	77.9*	França
16	T-16 <i>Bt indiana</i>	12.2*	França
Cepas da Embrapa Milho e Sorgo			
17	344 – <i>Bt tolworthi</i>	100	Foz do Iguaçu - PR
18	426 – <i>Bt tolworthi</i>	100	Araripe - CE
19	474 – <i>Bt galleriae</i>	30	Desconhecido
20	348B – <i>Bt alesti</i>		Desconhecido
21	348L – <i>Bt galleriae</i>		Desconhecido
22	460 – <i>Bt darmstadiensis</i>	100	Melissa - PR
23	461A – <i>Bt tolworthi</i>	100	Paraná
24	462A – <i>Bt galleriae</i>	100	Paraná

...continua...

“TABELA 1 Cont.”

Nº	Cepas com eficiência 100%	Mortalidade (%)	Local de coleta
25	S460	100	Desconhecido
26	BTLM	100	Desconhecido
27	566BLR	100	Desconhecido
28	701A	100	Assis - SP
29	701B	100	Assis - SP
30	1119C	100	Santa Helena – GO
31	1124E	100	Rio Verde – GO
32	1131A	100	Jataí – GO
33	1131C	100	Jataí – GO
34	1132A	100	Rio Verde – GO
35	1132C	100	Rio Verde – GO
36	1138G	100	Jataí – GO
37	1109N	100	Rio Verde – GO
38	1145B	100	Rio Verde – GO
39	1145C	100	Rio Verde – GO
40	1148F	100	Jataí – GO
41	1132E	100	Rio Verde – GO
42	1136B	100	Santa Helena – GO
43	1139K	100	Rio Verde – GO
44	1354	100	Desconhecido
45	1355	100	Desconhecido
46	1357E	100	Desconhecido
47	1603B	100	Santa Catarina
48	1641	100	Londrina - PR
49	1644	100	Rolândia - PR
	Cepas com eficiência 0%		
50	844K	0	Boa Esperança - MG
51	1097	0	Guapé - MG
52	1096A	0	Guapé - MG
53	1425B	0	Caruaru - PE
54	1431B	0	Simões Dias - SE
55	1540A	0	Caruaru - PE
56	1530A	0	Desconhecido

* Percentual de mortalidade descrito por Valicente e Fonseca (2004).

Informação cedida pelo laboratório de controle biológico, Embrapa Milho e Sorgo.

4.1 Extração e purificação do DNA

O DNA genômico das cepas de Bt foi isolado e purificado de acordo com Shuhaimi et al. (2001) com algumas modificações. As cepas foram plaqueadas em meio LB (Lurian Bertani) sólido por aproximadamente 12 a 16 horas em temperatura de 28°C. Com a alça de platina coletou-se uma pequena amostra e transferiu para 10 mL de meio LB líquido, e mantido sob agitação constante de 100 rpm e 28°C por um período de 16h.

Foi coletado um volume de 4 mL da cultura crescida e centrifugou-se em centrífuga modelo Eppendorf Centrifuge 5415C, a 4.600g por 5 minutos. O sedimento formado foi lavado com água ultra pura estéril e ressuscitado em 700 µL de solução tampão contendo (50 mM de Glicose, 25 mM de Tris/HCl e 10 mM de EDTA, pH 8,0) mais lisozima na concentração de 20mg/mL e foram levadas ao banho-maria a 37°C por 30 minutos. Após esse tempo, 25 µL de SDS 10 % e 5 µL de Proteinase K foram adicionados a cada amostra, seguido de incubação a 60°C durante uma hora. Em cada amostra foram adicionados 500 µL de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico na proporção de 25:24:1 seguido de centrifugação por um minuto a 12.000g. Aproximadamente 300 µL da fase aquosa superior foram transferidos para um novo tubo e acrescentados o mesmo volume de acetato de potássio 3M mais 600 µL de álcool isopropanol gelado e centrifugado a 12.000g por 10 minutos.

O sobrenadante foi descartado e o pellet lavado com etanol 70% e novamente centrifugado nas mesmas condições anteriores. O pellet foi seco de forma a não apresentar nenhum resíduo de etanol e ressuscitado em 150 µL de TE (Tris/EDTA).

As amostras contendo DNA genômico de cada cepa foram quantificadas em gel de agarose 1%. Após a quantificação foram preparadas as amostra de trabalho na 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 .

4.2 PCR utilizando primer ERIC e eletroforese dos produtos da reação

As reações de PCR foram realizadas em microtubos de 0,2 mL, sendo o volume total da reação de 20 μL . A reação foi constituída de 30 ng de DNA, 3 mM de MgCl_2 , tampão 10 X (20 mM de Tris e 50 mM de KCl), 250 μM de dNTP, 10 μM de cada primer e duas unidade de *Taq DNA Polimerase*.

As seqüências dos primers foram as utilizadas por Lima et al.(2002).

ERIC 1R 5' - ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3'

ERIC 2R 5' - AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'

As reações foram realizadas em termociclador modelo Mastercycler (Eppendorf, Hanburg, Germany), com as seguintes condições: desnaturação a 94°C por um minuto, anelamento a 50°C por um minuto, extensão a 72°C por dois minutos, e após 40 ciclos as amostras foram submetidas a uma etapa final de extensão a 72°C por 10 minutos.

Os fragmentos amplificados foram separados inicialmente em gel de agarose 1,5%. Alternativamente, foi utilizado gel de poliacrilamida 6% para separação dos fragmentos, com duração da corrida de aproximadamente duas horas a 150 V utilizando tampão TBE (500 mM EDTA pH 8,0; 1M TRIS pH 8,0; 0,089M ácido bórico) para a preparação do gel quanto para cuba de corrida. Após a corrida o gel foi corado com nitrato de prata 0,2% sendo visualizado em fotodocumentador Gel Logic 200 Imaging System.

4.3 PCR utilizando primer Bc-REP e eletroforese dos produtos da reação

As reações de PCR foram realizadas em microtubos de 0,2 mL, sendo o volume total da reação de 20 µL. A reação foi constituída de 50 ng de DNA, 3 mM de MgCl₂, tampão 10 X (20 mM de Tris e 50 mM de KCl), 250 µM de dNTP, 10 µM de cada primer e duas unidades de *Taq DNA Polimerase*.

As seqüências dos primers utilizados estão de acordo com o trabalho Ramirez & Ibarra (2005).

Bc-REP-1 5'-ATTAAAGTTTCACTTTAT-3'

Bc-REP-2 5'-TTTAATC AGTGGGG-3'

Para os primers REP o programa foi: desnaturação a 94°C por cinco minutos, seguido de 36 ciclos com temperatura de desnaturação de 94°C em um minuto, anelamento a 42 °C durante um minuto, extensão a 72°C por dois minutos. Adicionalmente, foi realizada uma etapa final de extensão a 72°C por sete minutos.

Os fragmentos amplificados a partir dos primers REP foram separados em gel de agarose 1,2%, com corrida em cuba horizontal com tampão utilizado para preparação e corrida do gel foi o TAE (0,001M EDTA pH 8,0; 0,04M TRIS pH 8,0; 0,02M ácido acético), a corrida foi realizada a 80V por aproximadamente 3 horas. Após esse tempo o gel foi corado em solução de brometo de etídio (1µg/mL) durante 15 minutos e descorado em água por 20 minutos, sendo visualizado sob luz ultravioleta e as imagens captadas pelo fotodocumentador Gel Logic 200 Imaging System.

4.4 Avaliação dos dados moleculares

As bandas obtidas pelos marcadores ERIC e REP foram analisadas visualmente, e construída uma matriz considerando os dados binários, em que o valor 1 (um) foi atribuído à presença da banda e o valor 0 (zero) para ausência.

4.5 Análises da diversidade genética

As relações genéticas entre as cepas foram avaliadas por meio de uma matriz de distância genética construída utilizando-se o complemento do Coeficiente de similaridade Jaccard (CSJ), a qual não considera as similaridades negativas, isto é, a ausência do produto. (Cruz & Carneiro, 2006).

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

A partir das estimativas de dissimilaridades, 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). Uma segunda análise de agrupamento foi realizada utilizando o método de Tocher. Todas estas análises foram realizadas com o auxílio do programa Genes (Cruz, 2001).

5 RESULTADOS E DISCUSÃO

5.1 Primers ERIC

Os fragmentos gerados nas reações de PCR foram primeiramente separados em gel de agarose, onde algumas amostras apresentaram bandas com coloração forte e fácil de visualizar, mas a maioria apresentou bandas com coloração fraca ou ausência das mesmas (Figura 1A). Diferentes concentrações de DNA foram testadas com o objetivo de se melhorar a resolução dos fragmentos amplificados, porém não se obteve sucesso (dados não apresentados). Como opção, as amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida o qual proporcionou uma melhor resolução, sendo possível visualizar bandas em todas as amostras (Figura 1B) e polimorfismos não detectados em gel de agarose.

Os trabalhos consultados relatam a utilização de géis de agarose para a separação dos fragmentos (Versalovic et al., 1994; Shuhaimi et al., 2001; Lima et al., 2002; Peruca et al., 2008), o que foi o diferencial nesse trabalho. O gel de poliacrilamida apresenta uma malha menos porosa e sensível, separando fragmentos com diferença de até um par de base, o que pode explicar a maior quantidade de polimorfismos em relação ao apresentado no gel de agarose.

A utilização da poliacrilamida foi necessária e muito informativa para os resultados, sendo possível visualizar maior número de bandas em relação ao gel de agarose. Dessa forma fica como sugestão para trabalhos futuros com os primers ERIC, a utilização de géis de poliacrilamida para separação de fragmentos. O número de bandas variou de 2 a 12 por cepa, com um total de 21 bandas distintas e fragmentos entre 220 a 3.054 pares de base.

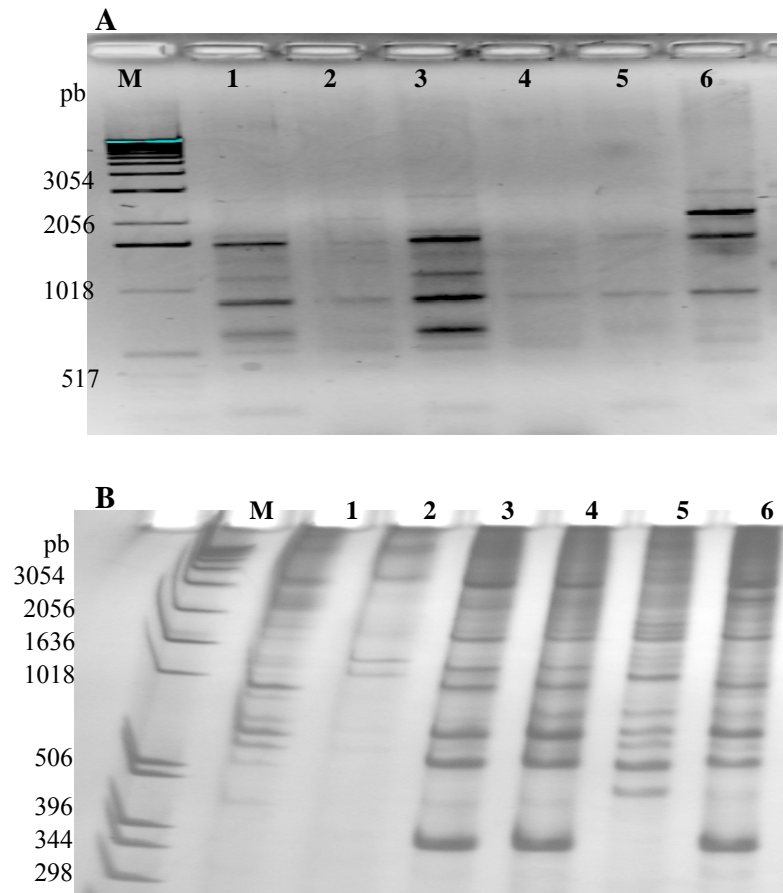


FIGURA 1 Resultados obtidos com o produto da amplificação do primer ERIC separados em gel de agarose e poliacrilamida. (A) Gel de agarose 1,2%, 1: 344 *Bt tolworthi*; 2: 1644; 3: T09 *Bt tolworthi*; 4: HD73 *Bt kurstaki*; 5: 1431B; 6: 1540A. (B) Gel de poliacrilamida 6,0%. 1: HD2 *Bt thuringiensis*; 2: HD3 *Bt finitimus*; 3: HD4 *Bt alesti*; 4: HD7 *Bt dendrolimus*; 5: HD11 *Bt aizawai*; 6: HD12 *Bt morrisoni* e M: Marcador molecular 1Kb

Por meio da análise que utilizou o agrupamento UPGMA e considerado uma distância de 60% (como ponto de corte), 14 grupos se formaram (Figura 2) sendo que os grupos 5, 6, 7 e 12 são formados apenas por cepas com 100% de

eficiência na mortalidade da *S. frugiperda* e sem identificação de subespécies. Os grupos 9 e 10 são formados apenas por cepas com 0% de eficiência na mortalidade da *S. frugiperda*. Já os grupos 2, 4, 8, 11 e 13 são formados por cepas com identificação da subespécie independente do percentual de mortalidade.

O grupo 3 se apresentou heterogêneo em relação à identificação de subespécie, sendo as cepas que o compõe são cepas com e sem essa identificação, por outro lado homogêneo em relação à mortalidade, pois todos os integrantes deste grupo apresentam eficiência de 100% na mortalidade da *S. frugiperda*.

O grupo 1 foi o mais heterogêneo, formado por cepas com e sem identificação de subespécie e cepas com 100% e 0% de eficiência na mortalidade da *S. frugiperda*. Lima et al., (2002) utilizaram primer ERIC em análises filogenéticas de *B. thuringiensis*, obtendo dois grupos, sendo um constituído por cepas com identificação de subespécie e outro com cepas sem subespécie e ainda identificou diferentes padrões de bandas para maioria das cepas.

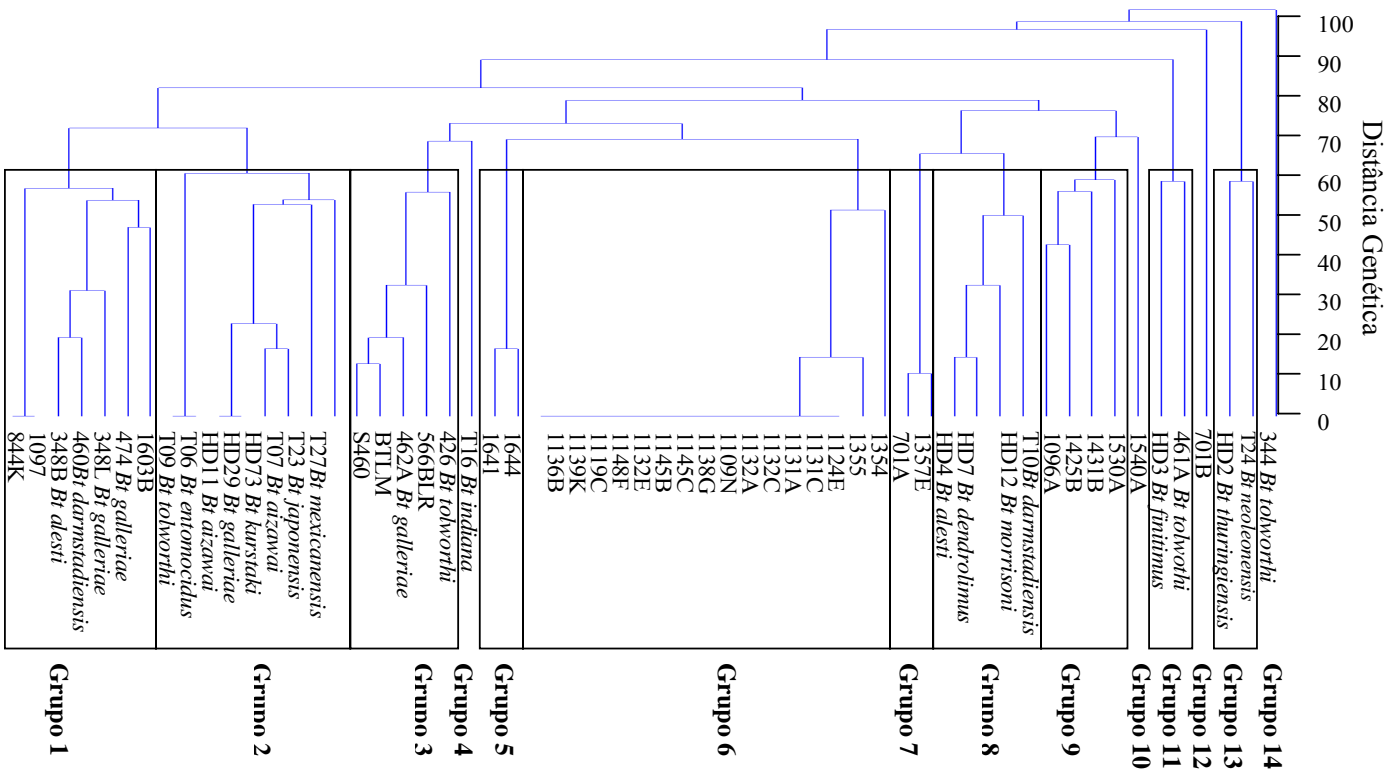


FIGURA 2 Dendrograma construído com base na matriz de dissimilaridade pelo complemento do Coeficiente de Jaccard, com os dados gerados pelo primers ERIC, usando o método das médias das distâncias (UPGMA)

5.2 Primers Bc-REP

Os fragmentos gerados pelos primers REP foram separados em gel de agarose. A boa resolução no gel possibilitou discriminar mesmo as bandas com coloração mais fracas (Figura 3). Todas as cepas apresentaram bandas que variaram de um a oito, com um total de 16 bandas distintas e fragmentos entre 2,0 a 3,8Kb. Nesse caso não foi necessário separá-los em gel de poliacrilamida, seguindo o padrão utilizado em outros trabalhos. Ramirez & Ibarra (2005) trabalhando com outras cepas de *B. thuringiensis*, utilizaram essa mesma seqüências do primers Bc-REP e gel de agarose, e detectaram grande polimorfismo.

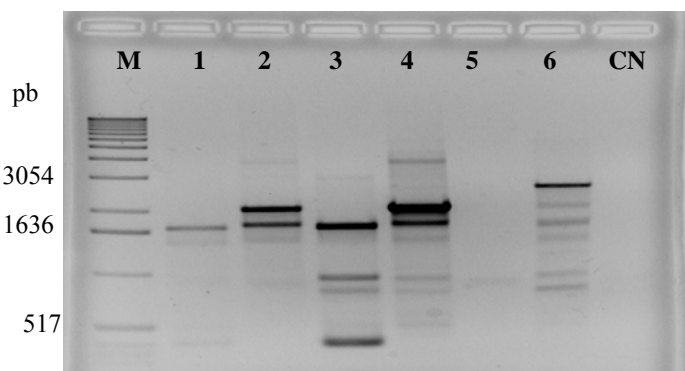


FIGURA 3 Produtos da amplificação do primer REP separados em gel de agarose 1,2%. Os números nas canaletas equivalem às cepas de Bt. 1: 1644; 2: 344 *Bt tolworthi*; 3: HD73 *Bt kurstaki*; 4: T09 *Bt tolworthi*; 5: 1431B; 6: 1530B; CN: Controle negativo e M: Marcador molecular 1Kb

Um grande número de cepas apresentou o mesmo perfil de bandas. Com isso o primer REP mostrou ser menos informativo que o primers ERIC. Lima et al., (2002) também detectaram maior polimorfismo com o primers ERIC mesmo utilizando géis de agarose para separação dos fragmentos.

A partir da matriz de distância genética gerada pelos dados fornecidos com o primers REP foi construído um dendrograma (Figura 4), e considerando uma distância de aproximadamente 55% (distância média) foram obtidos 15 grupos altamente heterogêneos com exceção do grupo 4 que apresentou homogeneidade com cepas 100% eficientes na mortalidade da *S. frugiperda*. Cepas pertencentes a subespécies diferentes tiveram similaridade como pode ser observado nos grupos 2 e 9. Ramirez & Ibarra (2005) também detectaram padrões idênticos para a sequência REP em cepas pertencentes a subespécies diferentes.

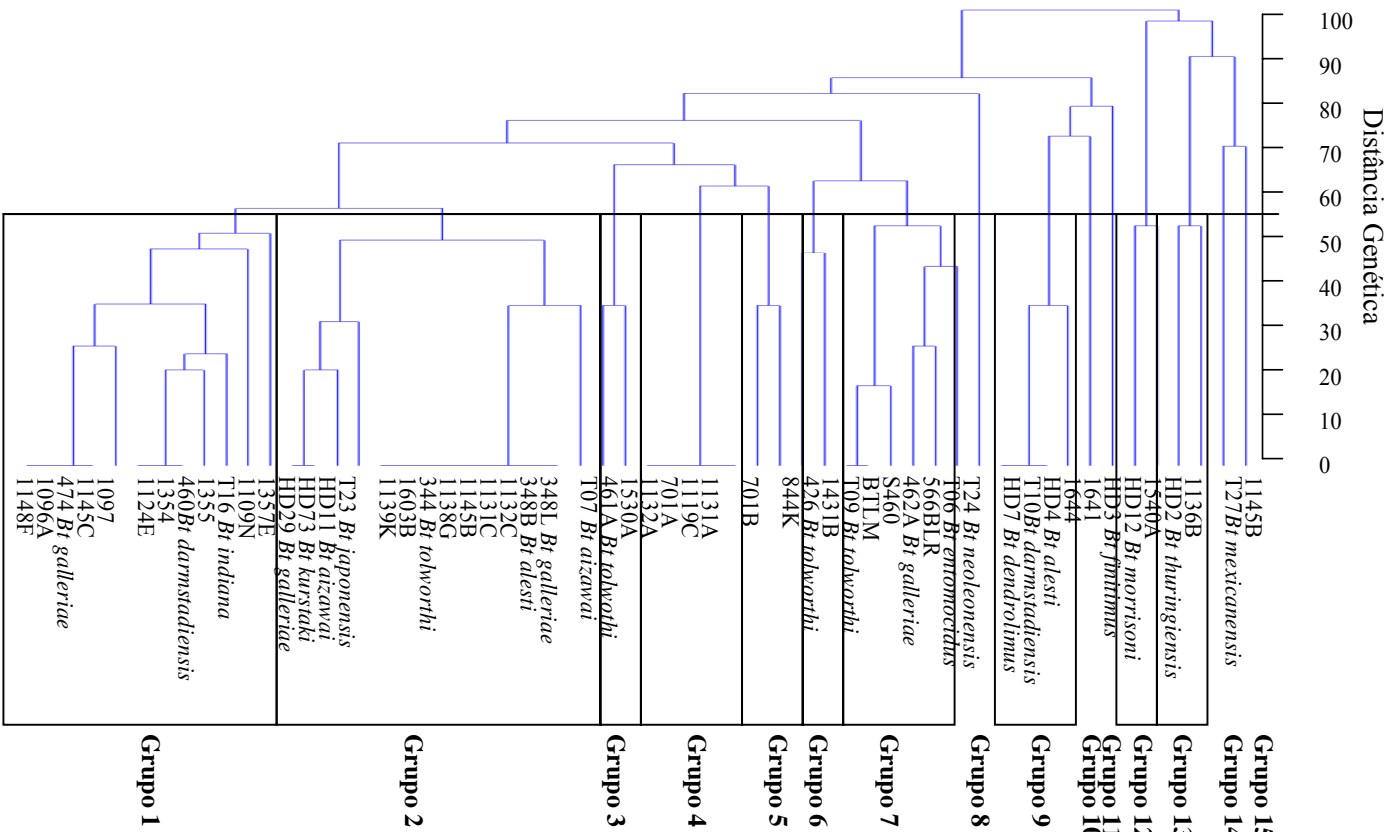


FIGURA 4 Dendrograma construído com base na matriz de distância pelo complemento do Coeficiente de Jaccard, com os dados gerados pelo primers Bc-REP, usando o método das médias das distâncias (UPGMA)

5.3 Análise em conjunto dos fragmentos gerados em reações com os primers ERIC e Bc-REP

Com a análise em conjunto podemos observar no dendrograma (Figura 5) que a cepa T24 *Bt neoleonensis* foi a mais distante geneticamente do restante dos grupos formados com uma distância de aproximadamente 100% seguido pela cepa 701B com aproximadamente 90%. As demais cepas formaram um grande grupo constituído de pequenos subgrupos. Considerando a média da distância da população foi definido um ponto de corte de aproximadamente 60% de distância. Com isso houve a formação de 21 grupos (Tabela 2), sendo o maior deles formado por cepas com 100% de eficiência na mortalidade da *S. frugiperda*. Dentro deste grupo as cepas 1131A, 1119C, 1132E e 1132A tiveram 100% de similaridade, da mesma forma as cepas 1138G, 1132C, 1131C, 1139K e 1145B e também a 1148F com 1145C. Essas e outras cepas foram utilizadas por Valicente em trabalhos realizados na Embrapa (CNPMS) (dados não publicados), onde primers específicos para os genes *cryI* eficientes contra a *S. frugiperda* foram testados. A grande maioria delas amplificou para o mesmo tipo de gene (Tabela 3).

Apesar das cepas com 100% eficientes terem similaridade e apresentarem amplificação para o gene *cryID*, as seqüências ERIC e REP não tem qualquer relação com os tipos de endotoxinas produzidas por estas bactérias (Lima et al., 2002). O uso desses primers leva à amplificação seletiva de regiões genômicas distintas localizadas entre as regiões repetitivas, (Rademaker & De Bruijin, 1997). A similaridade destas cepas está relacionada com o número destas seqüências presente no genoma de cada uma. Isso pode ser comprovado através das cepas que apresentaram os mesmos genes e não foram similares para as seqüências ERIC e REP como, por exemplo, a cepa 1354 e 1357E entre outras.

Da mesma forma cepas que tiveram alta similaridade para ERIC e REP não apresentavam o mesmo gene *cryI* como as cepas 1644 e 1641. A grande similaridade entre as cepas do grupo 21 pode estar relacionada ao local de origem (Tabela 1 dos materiais e métodos). Com exceção das cepas 1355 e 1354 que não tem essa informação, as demais foram coletadas no estado de Goiás sendo das cidades de Jataí, Rio Verde e Santa Helena localizadas no sudoeste deste estado. As cepas 1644 e 1641 pertencentes ao grupo 19 foram coletadas no norte do estado do Paraná e estão agrupadas com distância de 40%, assim como as cepas 844K (Zona da Mata) e 1097 (Sudoeste) coletadas no estado de Minas Gerais e com eficiência 0 % na mortalidade de *S. frugiperda* (grupo 18).

Com uma distância de aproximadamente 35% as cepas S460, 566BLR e 462 *Bt galliare* pertencentes ao grupo 12 foram coletadas no estado do Paraná sendo a cepa S460 da Colônia Melissa no oeste deste estado, as outras duas cepas não foi informado à cidade de coleta. Isso reforça os relatos de Hongyu et al. (2000) que a evolução de *B. thuringiensis* pode estar relacionado com a localização geográfica. As cepas 701A e 701B da cidade de Assis – SP, apesar de estarem na mesma cidade não se agruparam. Uma hipótese é que nesse local possam existir populações que se originaram de diferentes ancestrais (Aptosoglou et al., 1997; Lereclus et al., 1982).

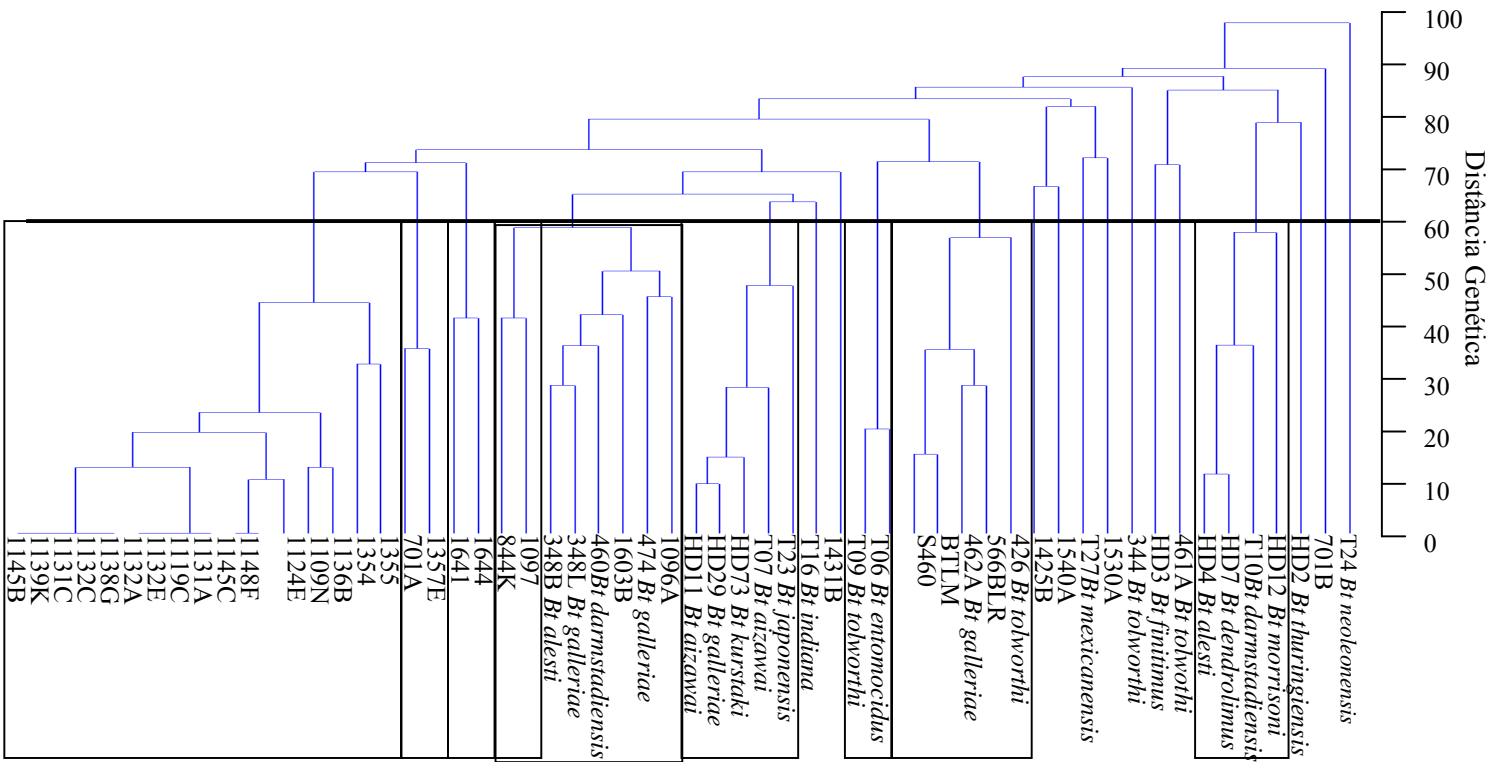


FIGURA 5 Dendrograma construído com a análise conjunta dos primers ERIC e Bc-REP, usando o método das médias das distâncias (UPGMA)

TABELA 2 Grupos obtidos entre as 56 cepas de *B. thuringiensis* com base no método das médias das distâncias (UPGMA) e considerando a ponte de corte em 60% de distância

<i>Grupos</i>	<i>Cepas Bt</i>
1	T24 <i>Bt neoleonensis</i>
2	701B
3	HD2 <i>Bt thuringiensis</i>
4	T10 <i>Bt darmstadiensis</i> - HD7 <i>Bt dendrolimus</i> - HD4 <i>Bt alesti</i> - HD12 <i>Bt morrisoni</i>
5	461A <i>Bt tolwothi</i>
6	HD3 <i>Bt finitimus</i>
7	344 <i>Bt tolwothi</i>
8	1530A
9	T27 <i>Bt mexicanensis</i>
10	1540A
11	1425B
12	426 <i>Bt tolwothi</i> - 566BLR - 462A <i>Bt galleriae</i> - BTLM - S460
13	T06 <i>Bt entomocidus</i> - T09 <i>Bt tolwothi</i>
14	1431B
15	T16 <i>Bt indiana</i>
16	T23 <i>Bt japonensis</i> - HD73 <i>Bt kurstaki</i> - HD29 <i>Bt galleriae</i> - HD11 <i>Bt aizawai</i> - T07 <i>Bt aizawai</i>
17	1096A - 1603B - 474 <i>Bt galleriae</i> - 460 <i>Bt darmstadiensis</i> - 348L <i>Bt galleriae</i> - 348B <i>Bt alesti</i>
18	1097 - 844K
19	1644 - 1641
20	1357E - 701A
21	1355 - 1354 - 1136B - 1109N - 1124E - 1148F - 1145C - 1131A - 1119C - 1132E - 1132A - 1138G - 1132C - 1131C - 1139K - 1145B

TABELA 3 Cepas de *B.thuringiensis* eficientes no controle de larvas de *S. frugiperda* e a relação de genes *cryI* presentes em cada uma

Cepas	Genes <i>cry</i>						
	<i>cry 1B</i>	<i>cry 1Ea/cryEb</i>	<i>cry1A</i>	<i>cry1Ab</i>	<i>Cry1Fb</i>	<i>cry 1D</i>	<i>cry 1C</i>
T09 <i>Bt tolworthi</i>	x	x	x	x	x		
426 <i>Bt tolworthi</i>	x	x	x	x	x		
344 <i>Bt tolworthi</i>	x	x	x	x	x		
460 <i>Bt darmstadiensis</i>	x	x	x	x	x		
461A <i>Bt tolwothi</i>	x	x	x	x	x		
462A <i>Bt galleriae</i>			x	x	x		x
BT LM	x	x	x	x	x		
566BLR	x	x	x	x	x		
701 A		x	x				
701B			x				
1119C		x					x
1124E		x					x
1131A							x
1131C							x
1132A							x
1132C							x
1138G							x
1109 N							x
1145B							x
1145C							x
1148F							x
1132 E							
1136 B		x					x
1139 K							x
1354	x		x	x	x		
1357E	x		x	x	x		
1355	x	x					
1641	x		x		x		
1644	x	x	x		x	x	x

Fonte: laboratório de controle biológico da Embrapa Milho e sorgo. Dados não publicados.

As cepas pertencentes as subespécies *tolworthi*, *alesti* e *darmstadiensis*, apresentaram-se em grupos diferentes, ou seja, não apresentaram similaridade para sequências ERIC e REP. Já a subespécie *aizawai* com duas cepas representantes (T07 e HD11) mantiveram-se no mesmo grupo, juntamente com T23 *Bt japonensis*, HD73 *Bt kurstaki* e HD29 *Bt galleriae*, enquanto a subespécie *galleriare* com quatro representantes se distribuiu, ficando no mesmo grupo a 348L e 474 e outras duas cepas (462A e H29) distribuídas em grupos diferentes.

O grupo 12 formado por 426 *Bt tolworthi*, 566BLR, 462A *Bt galleriae*, BTLM e S460, também apresentaram uma relação na amplificação dos genes, com exceção da cepa 462A que apresentou menor amplificação do gene *cryI* em relação às cepas pertencentes a esta subespécie (Tabela 3), a S460 não tem a informação destes genes. Dentre as 56 cepas avaliadas 12 não se agruparam quando considerado o ponto de corte em 60% de distância, entre elas estão cepas com eficiência 100%, 0%, e cepas com identificação de subespécie, essas cepas só apresentaram inclusas em grupos quando considerado distância maior que 60%.

Estes resultados 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 Ramirez & Ibarra (2005).

Na Figura 6 podemos observar os valores de bootstrap, aplicado para avaliar a consistência dos agrupamentos. O resultado dessa análise é o percentual de vezes que um determinado grupo aparece quando esta análise é repetida (1000 vezes) (Efron & Tibshirani, 1993). Assim foram obtidos valor de bootstrap de 100% quando as cepas HD3 *Bt finitimus* e 461A *Bt tolwothi* se agruparam com HD4 *Bt alesti*, HD7 *Bt dendrolimus*, T10 *Bt darmstadienis*, HD12 *Bt morrisoni*, HD2 *Bt thuringiensis* considerando uma distância 88% e

ainda obteve-se um percentual de bootstrap de 51% quando esse grupo se interligou com os demais, considerando uma distância de 90%. A cepa T24 *Bt neoleonensis* foi a mais distante dos demais grupos com consistência de 73%.

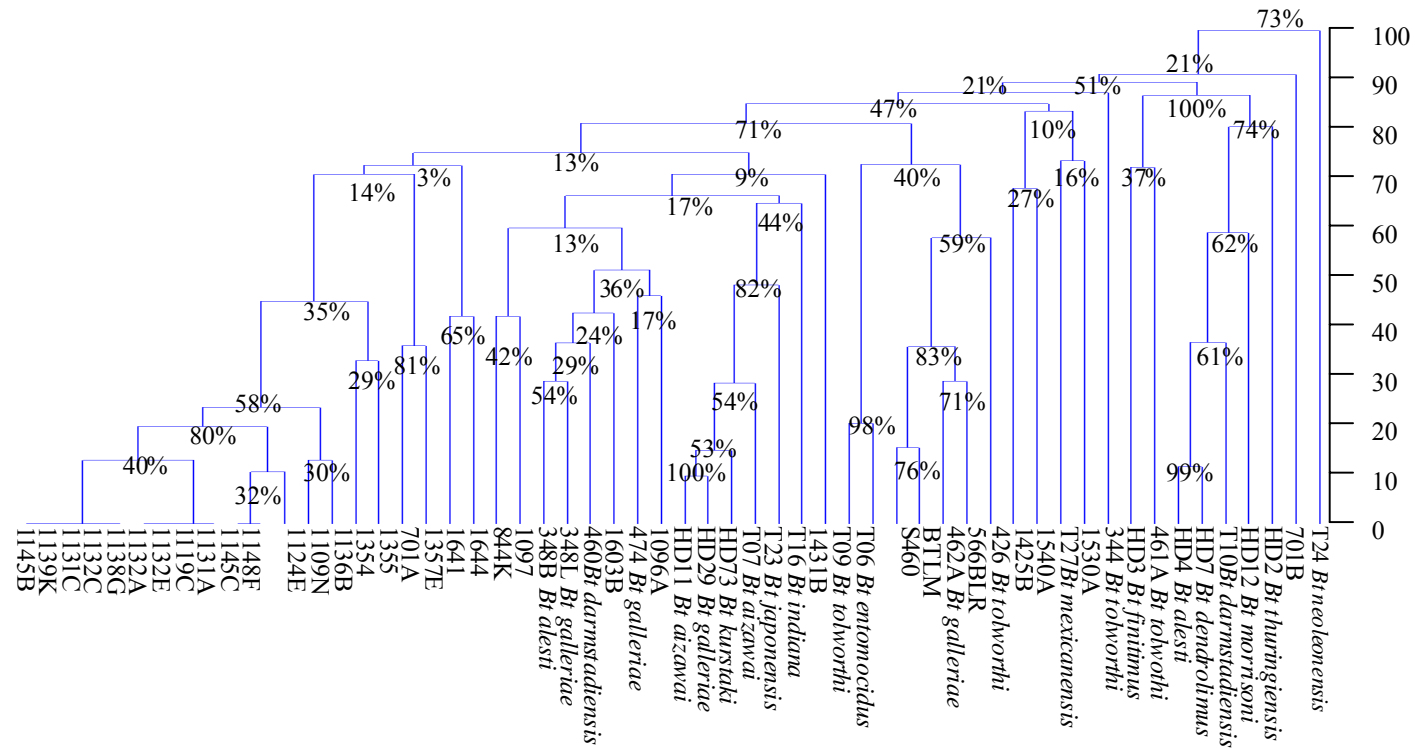


FIGURA 6 Dendrograma construído com a análise conjunta dos primers ERIC e Bc-REP, usando o método das médias das distâncias (UPGMA) com valores de consistência do agrupamento realizado pelo teste de bootstrap

Considerando ponte de corte de 60% de distância, obteve-se a formação de 21 grupos (Tabela 2) já relatados. Com o bootstrap podemos observar a consistências destes grupos (Figura 6), sendo o agrupamento entre HD29 *Bt galleriae* e HD11 *Bt aizawai* com 10% de distância o grupo com maior percentual (100%). A inserção de outras cepas nesse grupo apresentou valores de bootstrap acima de 50% sendo da HD73 *Bt kurstaki* (53%), T07 *Bt aizawai* (54%) e T23 *Bt japonensis* (82%), assim podemos dizer que o grupo 16 apresenta uma alta consistência. Outros grupos também apresentaram valores de bootstrap alto, como o grupo 13 (T09 *Bt tolworthi* e T06 *Bt entomocidus*) com distância 20% e consistência de 98%, grupo 20 (701A e 1357) com distância de 40% e percentual de bootstrap de 81% e o grupo 19 (1644 e 1641) com distância de 45% e consistência de 65%. Já o grupo 4 iniciou com o agrupamento de HD4 *Bt alesti* e HD7 *Bt dendrolimus* com uma distância de 13% e 99% de bootstrap, a cepa T10 *Bt darmstadienisse* se interligou com este grupo com uma distância de 38% e confiabilidade de 61%, um pouco mais consistente (62%) a cepas HD12 *Bt morrisoni* também se interligou a este grupo com uma distância de 59%. Por último o grupo 12 que iniciou com o subgrupo BTLM e S460, com uma distância de 17% e 76% de consistência, seguido pelo subgrupo 462A *Bt galleriae* e 566BLR com distância de 30% e valor de bootstrap de 71%. Estes dois subgrupos se interligaram com uma distância de 37% e consistência de 83%, sendo a formação do grupo 12 finalizada com a inserção da cepa 426 *Bt tolworthi* com distância de 57% e bootstrap 59%. Sendo assim os grupos 4, 12, 13, 16, 19 e 20 considerados altamente consistentes.

Foram considerados menos consistentes aqueles grupos com valores de bootstrap menores que 50%, como o grupo 18 (844K e 1097) com distância de 45% e 42% de confiabilidade. Já o grupo 17 é formado por dois subgrupos sendo que o primeiro deles iniciou com 348L *Bt galleriae* e 348B *Bt alesti* com uma consistência considerada alta (54%), enquanto os demais integrantes deste

subgrupo apresentaram baixo valor de bootstrap como 460 *Bt darmstadiensis* com distância de 28% e 29% de consistência e 1603 com distância de 45% e um percentual de confiabilidade de 24%. O segundo subgrupo (1096A e 474 *Bt galleriae*) apresentou uma distância de 48% e 17% de consistência, estes dois subgrupos se interligaram com 36% de bootstrap em uma distância de 53%.

O grupo 21 foi o maior grupo, formado por 4 subgrupos sendo o subgrupo 1 formado pela integração da cepa 1124E com 1148F e 1145C com uma distância de 10% e consistência de 32%, subgrupo 2 formado por 1136B e 1109N com distância de 13% e 30% no bootstrap, subgrupo 3 formado pela integração das cepas 1145B, 1139K, 1131C, 1132C e 1138G com as cepas 1132A, 1132E, 1119C e 1131A com uma distância de 13% e confiabilidade de 40%. O subgrupo 4 integra as cepas 1354 e 1355 com 32% de distância e 29% de consistência. O subgrupo 1 se interligou com o subgrupo 3 com uma consistência considerada alta (80%) em uma distância 20%, seguido pela integração do subgrupo 2 com 25% de distância e 58% de repetibilidade e finalizando com a integração do subgrupo 4 com 35% de consistência e 47% de distância, assim o grupo 21 foi considerado com baixa consistência.

Esta baixa consistência parece estar relacionada com número de marcas encontradas com os primers ERIC e REP, uma vez que estas cepas apresentaram menores números de marcas que as demais, ou seja, para confirmar essas similaridades é necessário um número maior de marcas ou ainda a utilização de outros marcadores moleculares como, o marcador AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), por exemplo, que apresenta um maior número de fragmentos e segundo Pattanayak et al. (2000) pode ser um excelente método para caracterização molecular de *Bt*.

O método de Tocher também foi utilizado para verificar a homologia do agrupamento com o UPGMA. A primeira análise feita com as 56 cepas formou cinco grupos (Tabela 4), sendo que o grupo 1 foi constituído por 51 cepas com média de 63% de distância, grupo 2 formado por HD2 *Bt thuringiensis* e HD3 *Bt finitimus* tiveram uma média de distância de 75%, e a maior distância foi entre o grupo 2 e 5, 96%.

Uma segunda análise foi realizada, incluído apenas as 51 cepas do grupo um, com isso 12 subgrupos se formaram, sendo os subgrupos 1.5 e 1.10 os mais distantes com 82% e o menos distantes 1.6 e 1.10 com 50%. Essa menor distância do subgrupo 1.6 e 1.10 provavelmente esteja relacionada com a subespécie já que as duas cepas pertencem a subespécie *tolworthi*.

A terceira análise incluindo as 26 cepas pertencentes ao subgrupo 1.1 formou 6 subgrupos com as menores distâncias, sendo do grupo 1.1.1 formado por cepas com eficiência de 100% na mortalidade da *S. frugiperda* com exceção da cepa 1096A que apresenta percentual de mortalidade de 0%. O grupo 1.1.2 foi formado pelas cepas 348B *Bt alesti*, 460 *Bt darmstadiensis*, 474 *Bt galleriae*, 1097 e 1603B, sendo as duas últimas cepas com mortalidades diferentes 0% e 100% respectivamente e as outras três cepas pertencentes a subespécies diferentes, assim um grupo altamente heterogêneo. Os demais grupos constituem de cepas únicas podendo ser discriminadas dos outros grupos com a maior distância entre o grupo 1.1.2 e 1.1.4 (45%). A falta de semelhança entre alguns grupos, pode estar relacionado a técnica de agrupamento ou ainda ao número de marcas utilizadas.

A maioria dos grupos formados com o método de Tocher apresentou homologia com os grupos obtidos com UPGMA. Na primeira análise de Tocher podemos notar (Tabela 4) que as cepas T24 *Bt neoleonensis*, 701B e 1540 se isolaram das demais, assim como no UPGMA quando utilizamos o ponto de corte 60% de distância.

TABELA 4 Distribuição das 56 cepas de *B. thuringiensis* em grupos estabelecidos pelo método de Tocher, a partir da matriz de dissimilaridade obtida pela análise conjunta dos primers ERIC e Bc-REP

Grupos	Relação de Cepas
1	T07 <i>Bt aizawai</i> - HD11 <i>Bt aizawai</i> - HD73 <i>Bt kurstaki</i> HD29 <i>Bt galleriae</i> - 348L <i>Bt galleriae</i> - 474 <i>Bt galleriae</i> 462A <i>Bt galleriae</i> -348B <i>Bt alesti</i> - HD4 <i>Bt alesti</i> 460 <i>Bt darmstadiensis</i> - T23 <i>Bt japonensis</i> T16 <i>Bt Indiana</i> - T06 <i>Bt entomocidus</i> HD7 <i>Bt dendrolimus</i> - T09 <i>Bt tolworthi</i> 461A <i>Bt tolwothi</i> - 344 <i>Bt tolworthi</i> 426 <i>Bt tolworthi</i> - T10 <i>Bt darmstadiensis</i> T27 <i>Bt mexicanensis</i> - HD12 <i>Bt Morrisoni</i> 1603B - 1096A – 1097 - 1145C - 1148F - 1131C 1132C - 1138G - 1145B 1139K - 1124E - 1109N 1119C - 1131A – 1132A - 1132E – 1355 -1136B 1354 - 844K - 1357E - 1644 - 1641 701A - BTLM 1530A - 1540A
2	HD2 <i>Bt thuringiensis</i> HD3 <i>Bt finitimus</i>
3	T24 <i>Bt neoleonensis</i>
4	1540A
5	701B

Uma segunda análise foi necessária, já que o grupo 1 foi formado por 51 das 56 cepas estudadas. Com esta segunda análise houve a formação de 12 grupos (Tabela 5). Os grupos 1.3, 1.5, 1.6, 1.7, 1.9, 1.10, 1.11 e 1.12 apresentaram 100% de homologia com os grupos 16, 19, 5, 11, 9, 7, 8 e 14 respectivamente (UPGMA), sendo que os grupos 16 e 19 apresentaram altamente consistentes com análise de bootstrap. Nos demais grupos e os grupos formados com terceira análise (Tabela 6) não tiveram homologia de 100%. A variação dos grupos foi muito pequena de uma análise para outra, sendo que as cepas presentes no grupo 1.1.1 foram as mesmas presentes no grupo 21 com exceção da 1096A. Apesar de fazermos usos de métodos diferentes de agrupamento, estas cepas se mantiveram no mesmo grupo e apresentam grandes similaridades para seqüências ERIC e REP o que torna interessante a aplicação de mais estudos para verificar a constituição genética destas cepas. Trabalho realizado por Valicente (dados não publicados) apresentou um tipo de gene (*cryID*) presente nestas cepas podendo haver outros tipos de genes menos eficiente na mortalidade da *Spodoptera frugiperda* ou ainda genes com eficiência pra outro inseto praga.

TABELA 5 Agrupamentos estabelecidos pelo método de Tocher a partir da segunda análise, incluindo apenas as 51 cepas de *B. thuringiensis* presentes no grupo 1

Grupos	Relação de Cepas
1.1	T07 <i>Bt aizawai</i> - 348B <i>Bt alesti</i> - 460 <i>Bt darmstadiensis</i> 474 <i>Bt galleriae</i> - 462A <i>Bt galleriae</i> - 1603B - 1096A 844 K - 1097 - 1145C - 1148F - 1131C - 1132C - 1138G 1145B 1139K - 1124E - 1109N - 1119C - 1131A 1132A - 1132E - 1355 - 1136B - 1354 - 1357E
1.2	HD11 <i>Bt aizawai</i> - HD29 <i>Bt galleriae</i> - HD73 <i>Bt kurstaki</i> T23 <i>Bt japonensis</i> - 348L <i>Bt galleriae</i> - T16 <i>Bt indiana</i>
1.3	HD7 <i>Bt dendrolimus</i> - HD4 <i>Bt alesti</i> T10 <i>Bt darmstadiensis</i> - HD12 <i>Bt Morrisoni</i>
1.4	S460 - BTLM 566BRL - 426 <i>Bt tolworthi</i> T06 <i>Bt entomocidus</i> - T09 <i>Bt tolworthi</i>
1.5	1641 - 1644
1.6	461A <i>Bt tolworthi</i>
1.7	1425B
1.8	701A
1.9	T27 <i>Bt mexicanensis</i>
1.10	344 <i>Bt tolworthi</i>
1.11	1530A
1.12	1431B

TABELA 6 Agrupamentos estabelecidos pelo método de Tocher apartir da terceira análise, incluindo apenas as 26 cepas de *B. thuringiensis* presentes no grupo 1.1

Grupos	Relação de Cepas
1.1.1	1119C – 1131A - 1132A – 1132E - 1131C – 1132C 1138G – 1145C – 1148F - 1109N – 1124E – 1139K 1136B – 1355 - 1096A – 1354 – 1145B
1.1.2	348B <i>Bt alesti</i> - 460 <i>Bt darmstadiensis</i> 474 <i>Bt galleriae</i> - 1097 -1603B
1.1.3	844K
1.1.4	T07 <i>Bt aizawai</i>
1.1.5	1357E
1.1.6	462A <i>Bt galleriae</i>

Cepas com 0% de eficiência na mortalidade da *S. frugiperda* mantiveram-se sozinhas em um determinado grupo ou ficaram distribuídas entre outros grupos. Hongyu et al. (2000) trabalhando com caracterização de genes *cry* eficientes na mortalidade de *Spodoptera exigua*, detectaram presença desses genes em cepas que apresentavam mortalidade 0-9% que provavelmente não estava sendo expresso.

Com o método UPGMA determinou-se o ponto de corte arbitrário para obtermos e formação de grupos mais específicos, já o método Tocher determina esse ponto de corte automaticamente de acordo com a matriz de dissimilaridade. Esse método não foi utilizado por nenhum dos trabalhos consultados sobre *B. thuringiensis*, mas mostrou grande homologia na formação dos grupos quando comparados ao UPGMA, podendo ser também neste caso utilizado como uma análise complementar em estudos da divergência genética de Bt.

Assim como no UPGMA a formação de alguns grupos parece estar relacionado com a localização geográfica, mais neste caso para confirmar essa relação mais análises são necessárias, como a utilização de cepas mais bem distribuídas por regiões e com percentual de mortalidades baixo, médio e alto. Não houve formação de grupos por subespécie assim como no agrupamento UPGMA, cepas de diferentes subespécies estão presentes em um mesmo grupo.

A utilização de primers ERIC e REP neste trabalho mostrou-se uma ferramenta molecular sensível, informativa e rápida. Identificando a diversidade genética existente entre cepas de *B. thuringiensis*. Podendo ser útil também para responder questões ligadas a relações geográficas desta espécie.

6 CONCLUSÕES

Os primers ERIC e Bc-REP detectaram grande divergência genética entre as 56 cepas de *Bacillus thuringiensis* com formação de 21 grupos pelo método UPGMA quando considerado uma distância de 60%.

Cepas pertencentes à mesma subespécie não foram altamente similares para seqüências ERIC e REP.

Houve formação de grupos com valores de bootstrap acima de 50%, sendo considerados consistentes.

Alguns grupos formados com o método Tocher apresentaram homologia com os grupos obtidos com o UPGMA quando considerado uma distância de 60%.

Alguns grupos parecem estar relacionados com mortalidade e local de origem, necessitando mais estudos para confirmação.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHERIF, A.; BRUSETTI L, L.; BORIN, S.; RIZZI, A.; BOUDABOUS, A.; KHYAMI-HORANI, H.; DAFFONCHIO, D. Genetic Relationship in the *Bacillus cereus* group by rep-PCR fingerprinting and sequencing of a *Bacillus anthracis*-specific rep-PCR fragment. **Journal Applied Microbiology**, Oxford, v.94, n.6, p.1108-1119, 2003.

CRUZ, C.D. **Programa genes**: versão windows; aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa, MG: UFV, 2001. 648p.

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

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

GILSON, E.; CLÉMENT, J.M.; BRUTLAG, D.; HOFNUNG, M. A family of dispersed repetitive extragenic palindromic DNA sequences in *E. coli*. **The EMBO Journal**, Oxford, v. 3, n. 6, p.1417-1421, Jun. 1984.

HIGGINS, C. F.; AMES, G.-F.L.; BARNES, W.M.; CLEMENTS, J.M.; HOFNUNG, M. A novel intercistronic regulatory element of prokaryotic operons. **Nature**, London, v. 298, n.5876, p. 760-762, Aug. 1982.

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, p.191–197, 2000.

LIMA, A.S.G.; GUIDELLI, A.M.; ABREU, I.L.; LEMOS, M.V.F. Identification of new isolates of *Bacillus thuringiensis* using rep-PCR products and δ -endotoxin electron microscopy. **Genetics and Molecular Biologic**, Ribeirão Preto, v.25, n.2, p.225-229, June 2002.

LOUWS, F.J.; RADEMAKER, J.L.W.; DE BRUIJN, F.J. The three Ds of PCR-based genomic analysis of phyto bacteria: Diversity, Detection and Disease Diagnosis. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.37, p.81-125, 1999.

PATTANAYAK, D.; SRINIVASAN, K.; MANDAOKAR, A.D.; SHUKLA, A.; BHALLA, R.; KUMAR, P.A. AFLP fingerprinting and genotypic characterization of some serovars of *Bacillus thuringiensis*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Dordrecht, v.16, n.7, p.667-672, 2000

PERUCA, A.P.S. **Determinação das relações genéticas entre populações simpátrica de *Bacillus cereus* e *Bacillus thuringiensis* pelo perfil de REP-PCR**. 2005. 125p. Dissertação (Genética e Biologia Molecular) Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

RADEMAKER, J.J.W.; DE BRUIJIN, F.J. Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer assisted patterns analysis. In: ANOLLES, G.G.; GRESSHOFF, P.M. (Ed.). **DNA markers: protocols, applications & overviews**. New York: J. Willey, 1997. p.151-171.

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, Mar. 2005.

SHARPLES, G. J.; LLOYD, R. G. A novel repeated DNA sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosomes. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 18, n.22, p. 6503-6508, Nov. 1990.

SHANGKUAN, Y. H. ; YANG, J.-F.; LIN, H.-C.; SHAIQ, M.-F. Comparison of PCR-RFLP, ribotyping and ERIC-PCR for typing *Bacillus anthracis* and *Bacillus cereus* strains. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 89, n.3, p.452-462, Sept. 2000.

SHANGKUAN, Y.H.; CHANG, Y.H.; YANG, J.-F; LIN, H.-C; SHAIQ, M.-F. Molecular characterization of *Bacillus anthracis* using multiplex PCR, ERIC-PCR and RAPD. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.32, n.3, p.139-145, Mar. 2001

SHUHAIMI, M.; ALI, A.M.; SALEH, N.M.; YAZID, A.M. Utilisation of eubacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) sequence-based PCR to fingerprint the genomes of *Bifidobacterium* isolates and other probiotic bacteria. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v.23, n.9, p.731-736, May 2001.

STERN, M.J.; AMES, G.F.; SMITH, N.H.; ROBINSON, E.C.; HIGGINS, C.F. Repetitive estragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. **Cell**, Cambridge, v.37, n.3, p.1015-1026, 1984

VALICENTE, F.H.; FONSECA, M.M. Susceptibilidade da lagarta-do-cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda*, a Diferentes isolados de *Bacillus thuringiensis*. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v.3, n.1, p.21-29, 2004

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

VERSALOVIC. J., SCHNEIDER, M., DE BRUIJN, F.J. & LUPSKI, J.R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, New York, v.5, p.25-40, 1994