

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

MAPEAMENTO GEOGRÁFICO DA OCORRÊNCIA DE CEPAS DE *Bacillus thuringiensis* NA REGIÃO DO TRIÂNGULO MINEIRO, DETERMINAÇÃO DA ESPECIFICIDADE NO CONTROLE DE *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOPTERA, NOCTUIDAE), E SUA VARIABILIDADE GENÉTICA

WANESSA ALTIMIRAS COSTA

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Uberlândia – MG
Julho - 1999

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

MAPEAMENTO GEOGRÁFICO DA OCORRÊNCIA DE CEPAS DE *Bacillus thuringiensis* NA REGIÃO DO TRIÂNGULO MINEIRO, DETERMINAÇÃO DA ESPECIFICIDADE NO CONTROLE DE *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOPTERA, NOCTUIDAE), E SUA VARIABILIDADE GENÉTICA

WANESSA ALTIMIRAS COSTA

LUIZ RICARDO GOULART FILHO

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

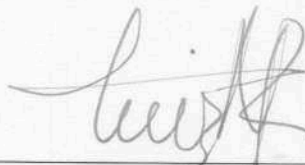
Uberlândia – MG
Julho - 1999

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

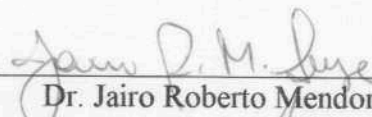
MAPEAMENTO GEOGRÁFICO DA OCORRÊNCIA DE CEPAS DE *Bacillus thuringiensis* NA REGIÃO DO TRIÂNGULO MINEIRO, DETERMINAÇÃO DA ESPECIFICIDADE NO CONTROLE DE *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOPTERA, NOCTUIDAE) E SUA VARIABILIDADE GENÉTICA

WANESSA ALTIMIRAS COSTA

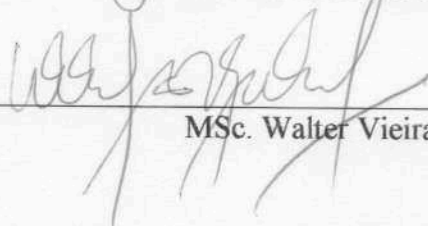
APROVADA PELA BANCA EXAMINADORA EM 27/07/99 Nota 100



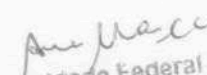
Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho



Dr. Jairo Roberto Mendonça Lyra



MSc. Walter Vieira da Cunha


Universidade Federal de Uberlândia
Centro de Ciências Biomédicas
Prof.^a Ana Maria Coelho Carvalho
Coordenadora do Curso de Ciências Biológicas

Uberlândia 27 de Julho de 1999

"NÃO SE TRATA DE DESCOBRIR E PERCORRER SOZINHO UMA ÚNICA VEZ UMA PISTA. MAS DE TRAÇAR E DE CONCLUIR, PARA USO DE MUITOS, UMA LARGA PISTA".

LEBRET

DEDICO:

AOS MEUS PAIS, ANTÔNIO CARLOS E MARIA LÊDA, QUE SEMPRE CONFIARAM, APOIARAM E ACREDITARAM EM MIM, E INCENTIVARAM-ME SEMPRE A VENCER CADA OBSTÁCULO SURGIDO NESSA MINHA CAMINHADA.

À MINHA TIA, ROSA DE LIMA, QUE FOI, E MESMO APÓS O SEU FALECIMENTO, CONTINUA SENDO UMA PESSOA MUITO IMPORTANTE EM MINHA VIDA

AGRADECIMENTOS

À DEUS, PELA VIDA.

AO PROFESSOR DR. LUIZ RICARDO GOULART FILHO, PELA OPORTUNIDADE DE TRABALHO, CONFIANÇA DEPOSITADA EM MIM E PELA ORIENTAÇÃO.

AO PROFESSOR DR. JAIRO ROBERTO MENDONÇA LYRA, PELA AMIZADE, PRESENÇA, ATENÇÃO E DEDICAÇÃO PARA COM A REALIZAÇÃO DESTE TRABALHO.

AO MSC. WALTER VIEIRA DA CUNHA, PELO ENVOLVIMENTO NESTE TRABALHO E PELOS "CORREÇÕES".

AO MSC. WALDESSE, POR TER ACEITO REPRESENTAR O PROFESSOR LUIZ RICARDO, DEVIDO A SUA AUSÊNCIA NO PAÍS.

AO DR. EDILSON PAIVA E AO MSC. FERNANDO HERCOS VALICENTE, POR TEREM ME RECEBIDO MUITO BEM NA EMBRAPA - CNPMS, E PELA ORIENTAÇÃO DURANTE OS ESTÁGIOS.

À JULIANA JULIÃO, PELA PACIÊNCIA E PRESTABILIDADE, AUXILIOU-ME MUITO, TANTO NO DECORRER DOS EXPERIMENTOS, QUANTO NO COMPUTADOR.

À VIVIAN ALONSO, PELO GRANDE AUXÍLIO DADO NO INÍCIO DO MEU ESTÁGIO NESTE LABORATÓRIO.

AO WARLEY, PELA PACIÊNCIA EM CADA EXPLICAÇÃO DADA.

AO CASAL ZÓ, WÂNIA E KLEBER, PELO AUXÍLIO E COLOCAÇÕES NESTE TRABALHO.

À BÁRBARA, PELA COLABORAÇÃO NO COMPUTADOR.

AOS COLEGAS, NATE, POMPEU, MIGUEL E MARLITON, POR TEREM COLABORADO NA REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS EFETUADOS NA EMBRAPA.

ÀS MINHAS AVÓS, FRANCISCA PITTOL E GENY BASTOS, À MINHA TIA LOURDINHA, E AOS MEUS IRMÃOS, WAGNER, WALKÍRIA E WANUSA, PELO AMOR, AMIZADE E APOIO RESERVADOS DURANTE TODOS ESSES ANOS.

AOS AMIGOS, CARINA, HAYDÉE, DAYANE E XANDE, PELO INCENTIVO, AMIZADE E CONFIANÇA.

A TODOS OS COLEGAS DO LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR E GENÉTICA, QUE DE ALGUMA FORMA CONTRIBUÍRAM PARA A REALIZAÇÃO DESTE TRABALHO.

A TODOS,
MUITO OBRIGADA!

RESUMO

Os insetos-praga causam danos econômicos à agricultura e competem com os seres humanos e outros seres vivos na busca de alimentos, além de transmitirem doenças em plantas e animais, inclusive na espécie humana. O uso em larga escala de inseticidas químicos para o controle desses insetos, tem levado à resistência dos mesmos, além de causar desequilíbrio biológico. Uma alternativa a este grave problema tem sido o controle biológico de insetos. Dos agentes utilizados no controle, destaca-se o *Bacillus thuringiensis*, uma bactéria que possui várias toxinas, tanto no esporo, quanto no cristal protéico. As toxinas presentes fazem com que o *Bacillus thuringiensis* seja altamente específico para certos hospedeiros e inócuo para outros insetos, plantas e vertebrados, além de ser completamente biodegradável. A genética tem contribuído muito, através de pesquisas, para o progresso no conhecimento e atuação dessa bactéria. Este trabalho teve como objetivos, mapear e isolar cepas de *Bacillus thuringiensis* na região do Triângulo Mineiro e efetuar testes de patogenicidade destas cepas nas larvas neonatas de *Spodoptera frugiperda*, e determinar as divergências genéticas nas cepas de *Bacillus thuringiensis* através da técnica RAPD. Foram isoladas 134 cepas extraídas do solo, distribuídas em 18 cidades do Triângulo Mineiro. Os testes de patogenicidade obtiveram uma eficiência de 0 a 26% de mortalidade em larvas de *Spodoptera frugiperda*. Para a realização da técnica RAPD, foram selecionadas 12 cepas de *B. thuringiensis* de acordo com a mortalidade (%) das larvas. Distribuíram-se 4 cepas a cada intervalo de 10%. Utilizaram-se também, 3 cepas-padrão de *B. thuringiensis* com especificidade para Lepidoptera, Coleoptera e Diptera para analisar a distância genética entre estas cepas e as cepas extraídas no Triângulo Mineiro. Selecionaram-se 7 "primers" de um total de 20, previamente testados. A distância genética avaliada por UPGMA, mostrou um alto grau de variabilidade entre as amostras, com uma média de 21,3 polimorfismos por primer. Foi evidenciado também que ao nível de 22% de dissimilaridade genética, houve um agrupamento de 9 das 12 cepas da região do Triângulo Mineiro em um grupo específico. Este grupo está mais próximo geneticamente, tanto da cepa específica para Lepidoptera, quanto da cepa específica para Diptera.

Palavras-chave: *Bacillus thuringiensis*, patogenicidade, RAPD

ÍNDICE

	Pág.
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1.8 - ENDOTOXINA	6
2.2. MARCADORES MOLECULARES	8
2.2.1. PCR	8
2.2.2. RAPD	9
3. OBJETIVOS	12
4. MATERIAL E MÉTODOS	13
4.1. <i>Bacillus thuringiensis</i>	14
4.2. <i>Spodoptera frugiperda</i>	15
4.3. ANÁLISE MOLECULAR DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE <i>B. thuringiensis</i>	19
4.3.1. EXTRAÇÃO DE DNA DAS CEPAS	19
4.3.2. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE	20
4.3.3. UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA RAPD	20
4.3.4. SEPARAÇÃO E VISUALIZAÇÃO DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS	22
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	23
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
6.1. SELEÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DAS CEPAS DE <i>B. thuringiensis</i>	24
6.2. TESTE DE PATOGENICIDADE	27
6.3. DETERMINAÇÃO DE POLIMORFISMOS POR RAPD-PCR	30
7. CONCLUSÕES	36
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

1. INTRODUÇÃO

Os insetos-praga causam danos econômicos à agricultura e competem com os seres humanos e outros seres vivos na busca de alimentos, além de transmitirem doenças em plantas e animais, inclusive na espécie humana. Constituem o grupo mais numeroso dentre todos os seres vivos encontrados no planeta, com uma estimativa de, no mínimo, seis milhões de espécies existentes (AZEVEDO, 1998).

O controle desses insetos na agricultura, foi e continua sendo feito por inseticidas químicos. Entretanto, o uso em larga escala destes produtos, tem levado à resistência dos insetos, tornando-se necessário a busca por novos inseticidas com cada vez mais teor de toxicidade. Esta técnica desencadeia desequilíbrio biológico, afetando insetos benéficos, como polinizadores e predadores naturais, além de causar sérios danos à saúde humana, principalmente para as pessoas que os aplicam, tendo como consequência o envenenamento do ecossistema como um todo e a própria morte de muitos seres vivos, inclusive o homem.

Uma alternativa a este grave problema tem sido o controle biológico de insetos. Esse controle pode ser realizado, principalmente, por outros insetos, e por

microrganismos, que dentro da nova estratégia de controle (Manejo Integrado de Pragas) tem minimizado os efeitos adversos já comentados.

De um modo geral, o uso de microrganismos para o controle de insetos-praga da agricultura não é recente e vem sendo empregado, principalmente após os anos 70, devido aos problemas advindos da utilização dos inseticidas químicos (AZEVEDO, 1998).

Dentre estes microrganismos, destacam-se, fungos, vírus, nematóides, protozoários e bactérias. Em se tratando de bactérias, a maioria utilizada, pertence às famílias Pseudomonodaceae, Enterobacteriaceae, Lactobacillaceae, Micrococcaceae e Bacillaceae. Pertencendo à última família citada, *Bacillus thuringiensis* tem se revelado o mais promissor. Em mais de 30 anos como agente de controle biológico, o *Bacillus thuringiensis* é responsável por 90 a 95% dos biopesticidas empregados no mercado (VALADARES-INGLIS *et al.*, 1998).

Com a finalidade de aumentar as possibilidades de emprego do *B. thuringiensis* no controle de insetos, o isolamento desta bactéria foi feito em diferentes lugares, principalmente do solo ou de insetos doentes (MARTIN & TRAVERS, 1989). O resultado foi a obtenção de milhares de cepas, muitas das quais, produzem toxinas com novas especificidades inseticidas. Este inseticida biológico é altamente específico para certos hospedeiros, e inócuo para outros insetos, plantas e vertebrados, sendo completamente biodegradável, não acumulando assim, resíduos tóxicos no meio ambiente (BOHOROVA, 1997).

A genética tem contribuído muito, através de pesquisas, para o progresso no conhecimento do *B. thuringiensis*. Atualmente, as técnicas de engenharia genética ocupam um papel de destaque na biologia e biotecnologia. A utilização cada vez maior de técnicas, como RFLP, RAPD e eletroforese em campo pulsado para estudos de taxonomia, variabilidade e marcação de microrganismos entomopatogênicos, indica sua incorporação em pesquisas na área (AZEVEDO, 1998). A variabilidade permite a distinção de indivíduos dentro das espécies e foi ela que possibilitou o surgimento das mesmas em resposta às modificações do

ambiente durante o processo evolutivo, sendo portanto, característica fundamental e de grande interesse no estudo dos seres vivos.

O *B. thuringiensis* produz uma gama de toxinas e o avanço biotecnológico de recombinantes de DNA, facilitou a disponibilidade de técnicas para clonar, manipular e transferir os genes tóxicos que codificam estas toxinas. Estas técnicas abriram amplas perspectivas para o sucesso desta bactéria na proteção de culturas mediante a aplicação do uso de suas toxinas por: transconjugação de plasmídios entre cepas de *B. thuringiensis* e entre estas e outras bactérias do gênero *Bacillus*; obtenção de plantas e microrganismos transgênicos que contém os genes que codificam as toxinas (ELY, 1993; GELERNTER & SCHWAB, 1993). Uma dessas toxinas é uma proteína denominada δ -endotoxina que apresenta ação extremamente tóxica e altamente específica para larvas de três ordens: Lepidoptera, Coleoptera e Diptera.

O *B. thuringiensis* tem sido utilizado no controle de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae). Este inseto possui metamorfose completa, ou seja, passa por quatro fases distintas durante seu ciclo de vida: ovo, larva, pupa e adulto. Seu ciclo dura em média 30 a 50 dias, dependendo da temperatura, pois, quanto maior a temperatura, menor o ciclo larval (CRUZ, 1995). O Triângulo Mineiro apresenta uma grande produção de milho, sendo *Spodoptera frugiperda* uma das principais pragas desta cultura, podendo causar até 37% de perda da produção (CARVALHO, 1970).

Desse modo, é de fundamental importância o estudo da genética, utilizando-se de sua biotecnologia para o aprimoramento de biopesticidas no mercado.

2. REVISÃO DE LITERATURA

O primeiro isolamento foi realizado no início deste século pelo bacteriólogo japonês ISHAWATA (1901), de larvas doentes do bicho da seda, *Bombyx mori*, o qual foi denominado posteriormente de *B. sotto*. Anos mais tarde, AOKI e CHIGASAKI (1915) demonstraram que apenas as culturas esporuladas de *B. sotto* eram tóxicas para o bicho da seda. Uma segunda bactéria de características similares foi isolada por BERLINER (1911) de larvas doentes de traça da farinha, *Anagasta kuehniella* procedentes de um moinho de Thuringia (Alemanha) a qual se denominou *Bacillus thuringiensis*.

HANNAY (1953) sugeriu a possível formação de uma substância tóxica relacionada com o cristal que induzia septicemia nas larvas de lepidópteros, o qual foi confirmado experimentalmente por ANGUS (1954, 1956 a, b, c). Em 1954 foi demonstrado que o corpo paraesporal era um cristal protéico, o qual atua como uma potente toxina contra determinados insetos (CAPALBO & MORAES, 1987).

Bacillus thuringiensis é uma bactéria em forma de bastonete (Figura 1), mesófila, aeróbia ou anaeróbia facultativa, gram positiva, que apresenta em seu interior o exospório, endósporo e o cristal protéico ou corpo paraesporal.

Normalmente, esta bactéria produz um só cristal por esporângio, e os cristais de cada sorotipo tendem a ter só uma forma, porém em alguns casos, encontram-se vários cristais no mesmo esporângio, os quais diferem tanto em tamanho e forma SHARPE & BAKER (1979); ARONSON *et al.* (1986), como nas propriedades bioquímicas e tóxicas. Algumas cepas da subespécie *Kurstaki* têm dois tipos de cristais: bipiramidal e ovoidal, que diferem tanto em sua ação tóxica como nas propriedades antigênicas (KRYWIENCZYK *et al.*, 1978; SHARPE & BAKER, 1979). A forma bipiramidal se encontra na maioria das subespécies de *B. thuringiensis* e são ativas contra lepidópteros e dípteros (YAMAMOTO & McLAUGHLIN, 1981; TOJO *et al.*, 1986).

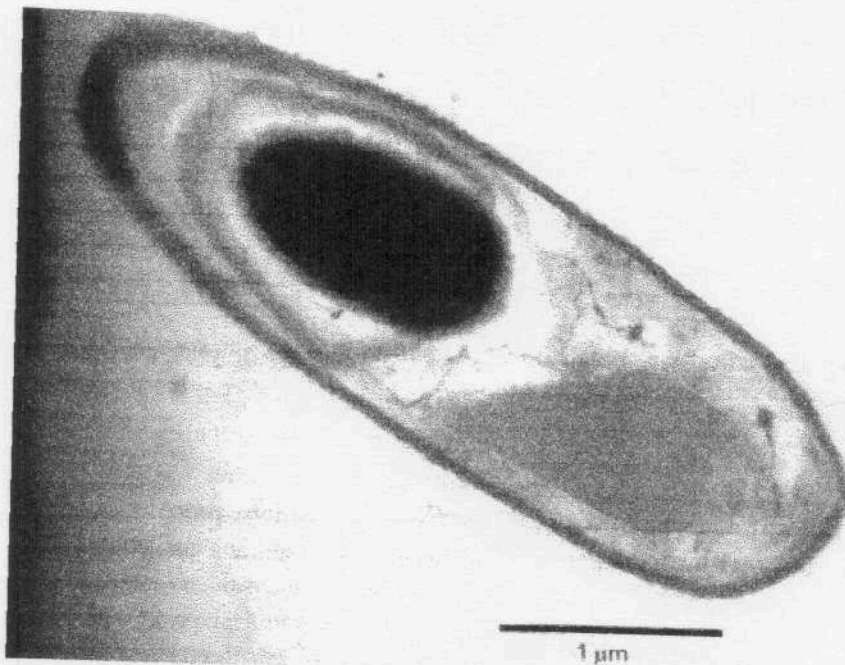


Figura 1: Microscopia eletrônica de *Bacillus thuringiensis*, mostrando à esquerda, o esporo e à direita, o cristal protéico. (fonte: V. Sanchis & P. Gounon, Instituto Pasteur, Paris, França)

RAUN *et al.* (1966) analisaram o papel de fatores ecológicos como radiação e temperatura, e estocagem a que são submetidos esporos de *B. thuringiensis* na sua patogenicidade a *Spodoptera frugiperda* e concluíram que a radiação ultravioleta sobre esporos de *B. thuringiensis*, durante 72 horas, elimina

sua patogenicidade para a espécie de noctuídeo; a temperatura média de 32°C acelera a mortalidade das larvas infectadas e suspensão de esporos estocada durante aproximadamente dez meses a 4°C são mais patogênicos do que suspensões frescas. O *B. thuringiensis* possui um verdadeiro arsenal de toxinas, tais como: alfa, beta, gama e delta. A δ -endotoxina do *B. thuringiensis* é específica para larvas de lepidópteros apesar de larvas de outros tipos de insetos (besouros, moscas e mosquitos) serem susceptíveis. Já os dípteros (*Musca domestica* e *Aedes aegypti*) são os mais susceptíveis a ação da beta-endotoxina (CAPALBO, 1986).

2.1. δ -ENDOTOXINAS:

HEIMPEL (1967), foi quem sugeriu o nome de δ -endotoxina para o cristal protéico do *Bacillus thuringiensis*. A dissolução deste cristal em meio alcalino (acima de pH 8), em tampões alcalinos redutores, ou em solução de enzimas proteolíticas, resulta em moléculas de tamanhos variáveis, das quais algumas são tóxicas para insetos. A δ -endotoxina é uma dessas moléculas, portanto, a dissolução desse cristal é necessária para sua liberação e atuação (HABIB & ANDRADE, 1998).

O modo de ação das δ -endotoxinas é citolítico e o alvo inicial é o epitélio intestinal médio. As toxinas nas células epiteliais levam a um desequilíbrio osmótico que acaba resultando na parada alimentar e posteriormente, na paralisia intestinal.

A partir da ingestão do corpo paraesporal pelo inseto susceptível, podem-se diferenciar algumas fases que levam a sua morte. A primeira fase é a dissolução do cristal pelos sucos gástricos do mesentério de pH alcalino, produzindo-se fragmentos protéicos não tóxicos denominados protoxinas. A eficácia deste processo de fragmentação depende tanto das condições do mesentério como da composição dos cristais. Na segunda fase, as protoxinas são ativadas por

proteólises dando lugar a fragmentos denominados toxinas. A composição da protease do mesentério junto com a estrutura das proteínas do cristal determinam a eficácia desta fase (HOFTE & WHITLEY, 1989). Na terceira fase, os fragmentos tóxicos se unem a receptores específicos existentes nas membranas das células epiteliais do mesentério (DULMAGE *et al.*, 1980). São evidenciados sintomas externos e internos em Lepidoptera quando infectadas por *Bacillus thuringiensis*. A perda de apetite e o abandono do alimento são os primeiros sinais da doença. Em seguida ocorrem regurgitações e diarreia, indicando efeito mais acentuado da δ -endotoxina no epitélio intestinal. O tegumento das larvas infectadas perde seu brilho, adquirindo coloração fosca, em função da invasão do patógeno na hemolinfa. Posteriormente, as larvas perdem a sua agilidade e o tegumento adquire tonalidades de cor marrom escura. Após a morte, a larva adquire coloração preta e começa rapidamente a deterioração dos tecidos, sem rompimento do tegumento (HABIB & ANDRADE, 1998).

Devido ao fato do grande número de isolados de *B. thuringiensis* obtidos em vários países e conseqüentemente aos problemas de classificação das diferentes variedades deste bacilo, foram introduzidos sorotipos baseados no antígeno flagelar ou antígeno H DE BARJAC & BONNEFOI (1962), além de parâmetros bioquímicos mais precisos, facilitando, com isso, a diferenciação entre os vários isolados (HABIB & ANDRADE, 1986). Também foi proposto por KRIEG *et al.* (1983), uma classificação em Patótipo, dependendo da ordem de insetos para os quais são ativos. São reconhecidos cinco patótipos de *B. thuringiensis*: Patótipo A, incluem cepas cujos cristais são tóxicos para lepidópteros; Patótipo B, incluem as cepas cujos cristais são tóxicos para dípteros, GOLDBERG & MARGALIT (1977); Patótipo C, incluem as cepas cujos cristais são tóxicos para coleópteros, KRIEG *et al.* (1983); Patótipo D, incluem as cepas com cristais tóxicos ao mesmo tempo para lepidópteros como coleópteros (BLENK *et al.*, 1989). Chegou-se a esta classificação devido a investigações a níveis de Engenharia Genética e estudos das toxinas. Já em 1989, quando 14 tipos

diferentes de δ -endotoxina haviam sido caracterizadas, Hofte e Whiteley propuseram uma nomenclatura baseada nas sequências de aminoácidos deduzidas e no espectro de atividade. Foram descritas cinco classes principais: CryI (ativa para Lepidoptera), CryII (Lepidoptera e Diptera), CryIII (Coleoptera), CryIV (Diptera) e Cyt (citolisina associada a CryIV), que, por não apresentar homologia com as demais classes ou atividade específica, foi distinguida como uma classe à parte. Uma nova toxina com atividade dupla para larvas de Coleoptera e Lepidoptera foi designada CryV (TAILOR *et al.*, 1992).

2.2. MARCADORES MOLECULARES

Pode-se definir marcador genético como um segmento cromossômico que pode ser acompanhado através das gerações, e que está ligado ou associado à alguma característica importante, sendo utilizado para identificar alelos daquele loci (BORGES, 1997).

O desenvolvimento de marcadores genéticos de DNA surgiu a partir do grande avanço proporcionado pelo estudo das isoenzimas (endonucleases), no início dos anos 70, que eram capazes de cortar a molécula de DNA em um grande número de sítios específicos para cada indivíduo (SOLLER, 1990).

2.2.1. PCR

A PCR é um método “*in vitro*” de produção de grandes quantidades de fragmentos de DNA a partir de pequenas quantidades por uma polimerase termoestável (Taq DNA polimerase), que é isolada de uma eubactéria termofílica *Thermus aquaticus*. Na amplificação enzimática pela polimerase, um fragmento é flanqueado por dois oligonucleotídeos que hibridizam com as cadeias opostas de sequência alvo (WHITE *et al.*, 1989). Uma série repetitiva de ciclos envolvendo

desnaturação do DNA molde, anelamento de “primers” e extensão deles pela Taq DNA polimerase, resulta em um acúmulo exponencial de um fragmento específico de DNA. As extremidades dos fragmentos são definidos pelo término 5' dos “primers”. Como o produto da extensão dos “primers” acumula à cada ciclo e pode servir como um molde para o próximo ciclo, o número de cópias alvo dobra aproximadamente cada ciclo (BOEHRINGER MANNHEIM BIOCHEMICA, 1995).

A quantidade de ciclos da reação, o tempo de extensão, a temperatura e a quantidade de Taq DNA polimerase influenciam na eficiência e especificidade da enzima. Reações com 35 ciclos têm uma eficiência melhor do que com 20 ciclos e quanto maior o tempo de extensão e quantidade de Taq DNA polimerase, pior a especificidade da reação. Quanto à temperatura de anelamento, aumentando-se a temperatura, diminui o aparecimento de produtos inespecíficos (SAIKI *et al.* apud CUNHA, 1999).

A presença de agentes inibidores e a concentração de $MgCl_2$ podem interferir na produtividade da reação de amplificação. Alguns agentes inibidores são descritos por ROUX (1995), como detergentes iônicos (SDS e Sarcosil, usados na extração de DNA), fenol, heparina, xileno cianol e azul de bromofenol.

Com o desenvolvimento da tecnologia da reação em cadeia da polimerase, inúmeras outras técnicas (RAPD, AFLP, RNA display, VNTR e outras) foram desenvolvidas para a detecção de polimorfismos de DNA.

2.2.2. RAPD

A técnica RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) ou DNA polimórfico amplificado ao acaso, é derivada de outra técnica designada PCR (Polymerase Chain Reaction) ou reação de polimerase em cadeia (AZEVEDO, 1998). Esta técnica foi desenvolvida independentemente nos Estados Unidos em

1990 por WILLIAMS *et al.* e WELSH & MACCLELLAND, com a idéia de se utilizar “primers” mais curtos e de sequência arbitrária para dirigir a reação de amplificação, eliminando assim a necessidade do conhecimento prévio de sequência. A técnica RAPD foi um grande avanço tecnológico em termos de marcadores moleculares, pois requer baixo custo, não necessita de um desenvolvimento prévio de uma biblioteca de sondas específicas, não utiliza isótopos radioativos ou marcação radioativa, quantidade mínima de DNA utilizada. Reúne portanto, a simplicidade técnica da visualização direta dos marcadores isoenzimáticos, com o poder de resolução dos marcadores de DNA e a rapidez da manipulação de sua técnica (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

As aplicações de RAPD são amplas, incluindo a obtenção de “fingerprints” genômicos de indivíduos, variedades e populações; a análise da estrutura e diversidade genética em populações naturais, populações de melhoramento e bancos de germoplasma; o estabelecimento de relacionamentos filogenéticos entre diferentes espécies; a construção de mapas genéticos de alta cobertura genômica e a localização de genes de interesse econômico (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

O comportamento dos marcadores RAPD é de caráter dominante. Os polimorfismos são detectados como presença (homozigoto dominante e heterozigoto) ou ausência de bandas (homozigoto recessivo). A ausência de bandas representa o conjunto de todos os alelos de um determinado *locus* que não pode ser amplificado devido a inserções, deleções ou mutações de ponto no sítio de anelamento dos “primers”. Desse modo, a técnica RAPD detecta apenas um alelo em cada “locus”. O “primer” encontra várias sequências de DNA complementares, quando tais sequências estão a menos de 4000 pares de bases e em orientação oposta, a região do DNA inclusa pode ser amplificada pela polimerase (OLIVEIRA, 1998). O segmento pode ser visualizado na forma de uma banda num gel de eletroforese. A eletroforese é geralmente conduzida em gel de agarose e a visualização é feita com brometo de etídio em luz ultravioleta.

A amplificação de DNA em PCR de um modo geral, é diretamente afetada pela temperatura, concentração de $MgCl_2$, sequência dos “primers” e DNA molde. São observados também, variações nos padrões RAPD entre termocicladores e polimerases diferentes. MEUNIER & GRIMONT (1993) testaram dois termocicladores e duas marcas diferentes de Taq polimerase com diferentes amostras de DNA, por seis vezes. Eles observaram que a reprodutibilidade foi excelente quando usados o mesmo termociclador e Taq polimerase.

Uma vez que todos esses fatores forem controlados, diagnósticos com marcadores RAPD, identificados em diferentes laboratórios, poderão ser permutáveis e condizentes (SCHIERWATER & ENDER, 1993).

3.OBJETIVOS

- Mapear e isolar cepas de *Bacillus thuringiensis* na região do Triângulo Mineiro;
- Efetuar testes de patogenicidade das cepas de *B. thuringiensis* nas larvas de primeiro instar de *Spodoptera frugiperda*;
- Determinar as divergências genéticas nas cepas de *B. thuringiensis* através da técnica RAPD.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Foram isoladas 314 cepas de *B. thuringiensis* extraídas do solo da região do Triângulo Mineiro e regiões adjacentes. As amostras foram obtidas do laboratório de Análise de Solo do Departamento de Agronomia da Universidade Federal de Uberlândia e os experimentos, realizados nos laboratórios de Genética Molecular e Controle Biológico da Universidade Federal de Uberlândia e nos laboratórios de Biologia Molecular e Controle Biológico do Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo - CNPMS.

Esta investigação consistiu nas seguintes etapas: a obtenção, manutenção e caracterização de isolados de *B. thuringiensis*, extração e purificação do DNA da bactéria, quantificação do DNA através do espectrofotômetro e qualificação do DNA por eletroforese, utilização da técnica RAPD para identificação da divergência genética das cepas, criação de insetos em laboratório e teste de patogenicidade "in vitro".

4.1. *Bacillus thuringiensis*

* ISOLAMENTO DAS CEPAS

Pesou-se 1g de solo e diluiu-se em 5 ml de solução salina (0,8g NaCl/l), deixando agitar em “overnight”. Em seguida, foi agitado em “vortex” e após a decantação, transferiu-se 1 ml da suspensão para um microtubo. Os microtubos foram incubados a 65°C por 30 minutos e, imediatamente colocados por 5 minutos no gelo. Foram plaqueados 200µl da suspensão em meio sólido com penicilina e incubados por 36 horas a 30°C.

As colônias crescidas foram observadas em microscópio de contraste de fase, usando-se lente de 100 vezes de aumento, e as que apresentaram o cristal protéico, caracterizando-o como *B. thuringiensis*, foram multiplicadas e encaminhadas para os testes de patogenicidade, em *Spodoptera frugiperda*, (Lepidoptera, Noctuidae) (CAPALBO & MORAES, 1987; SHARPE & BAKER, 1979; ARONSON *et al.*, (1986).

*. MEIO DE CULTURA - LB (Luria Bertarie Medium)

Para cada 1L de meio, foram utilizadas 10g de Bacto-tryptone, 05g de Bacto-yeast extract e 10g de NaCl. Esterilizou-se em autoclave por 20 minutos e esperou esfriar até a temperatura suportável ao toque da mão (em torno de 50°C), acrescentando-se 30 mg de Penicilina G. Para meio sólido, utilizou-se 12g/l de bactoágar, sendo adicionado antes de levar o meio para autoclavar. O meio de cultura foi preparado segundo SAMBROOK *et al.*, (1989) com algumas modificações.

4.2. *Spodoptera frugiperda*

*. CRIAÇÃO

Para a utilização das larvas neonatas no preparo dos bioensaios (teste de patogenicidade), foi mantida uma população do inseto em todas as fases, ou seja, ovo, larva, pupa e adulto. Utilizou-se para a criação, temperatura de 28^oC e fotoperíodo de 14 horas, segundo procedimento seguido pela EMBRAPA-CNPMS.

O início da criação foi realizado obtendo-se ovos e pupas do laboratório de criação de insetos do Centro Nacional de Milho e Sorgo - EMBRAPA-CNPMS.

*. OVOS:

A postura dos ovos foi agrupada em massa (Figura 2). Pedacos de papel de germinação contendo essas massas, foram recortados e transferidos para copos de plástico fechados até a eclosão das lagartas.

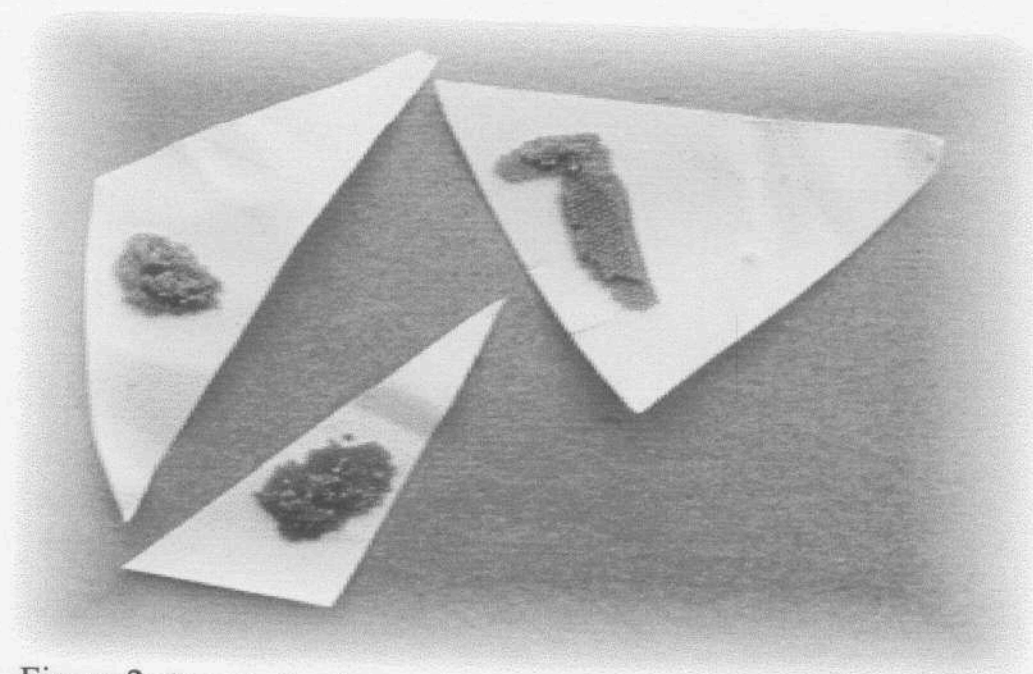


Figura 2: Ovos de *Spodoptera frugiperda*

*. LAGARTAS:

Uma parcela das larvas neonatas foi utilizada para a realização dos bioensaios e outra parcela, para a manutenção desta espécie no laboratório. As larvas para a manutenção, foram mantidas em um mesmo copo contendo um cubo de 1cm x 1cm x 1cm de dieta até, aproximadamente, o quarto dia de vida (Figura 3). Em seguida, as larvas foram individualizadas em novos copos descartáveis contendo dieta. Para a realização dos bioensaios, foram utilizadas bandejas de isopor perfuradas com capacidade de até 24 copos, de acordo com metodologia seguida na EMBRAPA-CNPMS.



Figura 3: Neonatas de *Spodoptera frugiperda* antes de serem individualizadas

*. PUPAS:

As pupas, (Figura 4) 24 horas após a transformação, foram transferidas para os cilindros de criação dos adultos.

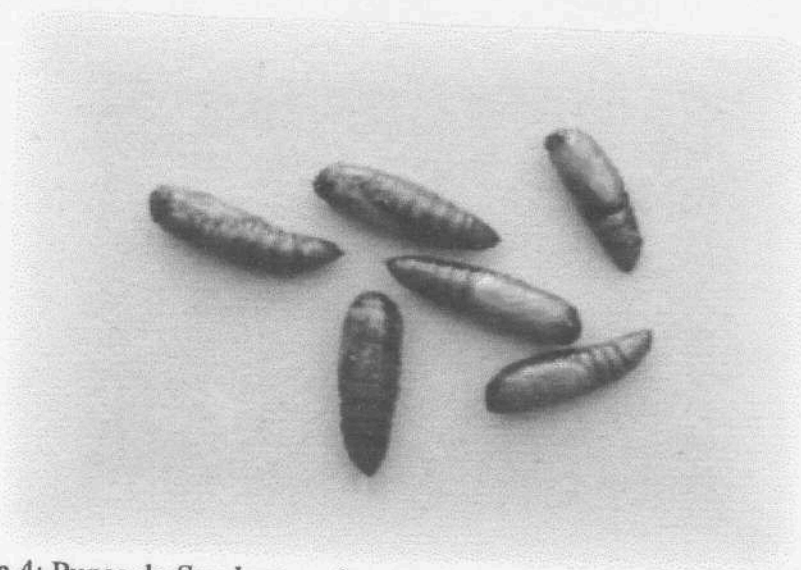


Figura 4: Pupas de *Spodoptera frugiperda*

***. ADULTOS:**

As pupas, vinte e quatro horas após a transformação, foram colocadas em um cilindro de 24 cm de altura e 10 cm de diâmetro, sendo o seu interior envolvido com papel de filtro e sua base e ápice fechados também com papel de filtro, destinados a receber os ovos. Para a alimentação dos adultos, foram colocados copinhos plásticos de 50 ml, contendo solução aquosa de mel a 10%, a qual foi fornecida por capilaridade através de um pavio de algodão embebido no líquido. O alimento foi substituído a cada dois dias, período suficiente para que não ocorresse fermentação. O adulto de *Spodoptera frugiperda* está representado na Figura 5.

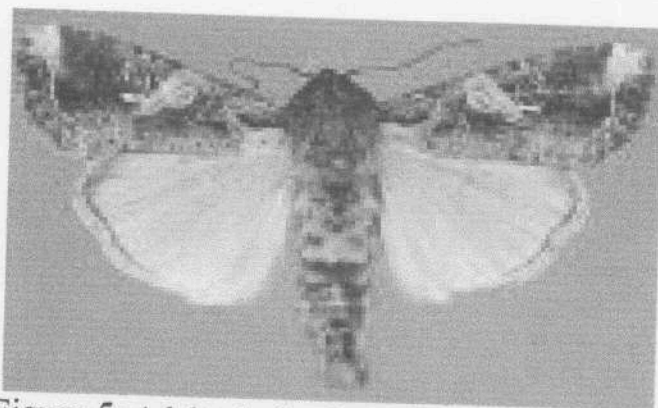


Figura 5: Adulto de *Spodoptera frugiperda*

*. TESTE DE PATOGENICIDADE

As colônias de bactérias que possuíam cristal protéico foram isoladas e em seguida, prepararam-se suspensões de bactéria com água destilada. Pedacos de dieta artificial de 1cm X 1cm foram mergulhados nas suspensões preparadas, e as lagartas, juntamente com a dieta inoculada, foram colocadas individualmente em copos descartáveis de 50 ml, com tampas de acrílico, sendo inoculadas sob temperatura de 29^oC, de acordo com os procedimentos descritos pelo CNPMS. As avaliações de mortalidade das lagartas de cada bioensaio, foram feitas no período de sete dias.

*. DIETA ARTIFICIAL UTILIZADA: COMPOSIÇÃO E PREPARO

Foi utilizado uma dieta a base de feijão que vem sendo usada na EMBRAPA – CNPMS com sucesso, cuja composição está descrita na Tabela 1.

Tabela 1: Nutrientes utilizados em dieta artificial de *Spodoptera frugiperda*.

COMPONENTES	QUANTIDADE
FEIJÃO	166,5 g
LEVEDURA DE CERVEJA	50,7 g
GERME DE TRIGO	79,2 g
ÁCIDO ASCÓRBICO	5,1 g
ÁCIDO SÓRBICO	1,65 g
NIPAGIN	3,15 g
ÁGAR	25,5 g
ÁGUA DESTILADA	1195 ml
FORMOL 10%	12,5 ml

Esta quantidade é suficiente para 300 recipientes de criação (copinhos plásticos de 50 ml).

Para o preparo da dieta, homogeneizaram-se os ingredientes no liquidificador, exceto o ácido ascórbico, ácido sórbico, formol e 500 ml da água, que devem ser deixados em repouso. Os ingredientes homogeneizados no liquidificador, foram levados ao fogo até sua fervura. Os dois conteúdos foram misturados e homogeneizados através de um agitador elétrico, sendo a dieta transferida, ainda quente, para bandejas que foram conservadas em geladeira para usos posteriores.

4.3. ANÁLISE MOLECULAR DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Bacillus thuringiensis*

4.3.1. EXTRAÇÃO DE DNA DAS CEPAS:

A extração do DNA genômico das bactérias obedeceu o procedimento descrito por SAMBROOK *et al.* (1989) com alterações. O método, basicamente, utilizou o detergente SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) para a lise celular. Os resíduos celulares, proteínas e polissacarídeos foram precipitados juntamente com o SDS, que é insolúvel na presença do Acetato de Potássio (5 M), ficando em solução ou suspensão somente os ácidos nucleicos e algumas poucas proteínas contaminantes. O DNA foi purificado, adicionando-se etanol e clorofórmio e posteriormente apenas com adições de clorofórmio. O DNA foi precipitado pela adição de isopropanol gelado, sendo o "pellet" ressuspensionado com água deionizada.

O DNA foi quantificado por absorvância a 260 nm em espectrofotômetro HITACHI U-2000. Uma alíquota de 10 µl de cada amostra foi diluída em 990 µl

de água ultrapura para a leitura. Foi utilizada a seguinte fórmula para o cálculo da concentração:

$$[\text{DNA}] = \text{Abs (260)} \times 50 \times \text{Fator de Diluição}$$

Em seguida, foi realizada diluição para uma concentração final de 10 ng/ μl , para ser utilizado nas análises por RAPD. O DNA foi qualificado antes de sua diluição, utilizando-se 10 μl de DNA através da eletroforese em agarose 0,8%.

4.3.2. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

O gel de agarose foi feito segundo RICKWOOD & HAMES (1990), onde foi dissolvido 8 g de agarose em 100 ml de Tampão TBE 1X. Aqueceu-se a solução em uma temperatura de 45^oC, em seguida, esta solução foi colocada em uma cuba horizontal e esperou-se sua polimerização para aplicar as amostras.

A eletroforese foi submetida a uma voltagem de 100 Volts por duas horas.

Para a visualização das bandas de DNA, os géis foram corados com brometo de etídio (10 mg/ml), e após a separação eletroforética, os géis foram visualizados em luz ultravioleta (UV).

4.3.3. UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA RAPD

A técnica de Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso (RAPD) foi utilizada para analisar a divergência genética através da amplificação de genes específicos do *B. thuringiensis*.

Para a utilização desta técnica, foi realizada uma seleção das cepas de *B. thuringiensis* de acordo com o percentual de mortalidade obtido, enquadrando-se quatro cepas a cada intervalo de 10%.

Foram utilizadas três cepas de *Bacillus thuringiensis* de especificidade conhecida, como padrão para comparação com as cepas do Triângulo Mineiro, (Tabela 2).

Tabela 2: Origem e especificidade das três cepas utilizadas como padrão

CEPA	ORIGEM	ESPECIFICIDADE
Purdue-1	Purdue University	Coleoptera
HD27-2	EMBRAPA-CNPMS	Lepidoptera
Fio 584-3	Instituto Oswaldo Cruz	Diptera

Foram testados 20 “primers”, obtendo-se destes, 7 “primers” informativos.

Todos os 7 “primers” selecionados são curtos de 10 pb (sequência arbitrária), obtidos de Kits da OPERON Technology (Tabela 3). Cada reação de amplificação continha Tampão Tris-HCl 10 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, 10 ng de DNA genômico, 1,5U de Taq DNA polimerase, 12 pmoles de “primer”, 200 µM de cada dNTP (dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 3µl de BSA (10mg/ml), completando-se o volume final para 25 µl com água destilada – deionizada. Cada reação foi coberta com duas gotas de óleo mineral (utilizou-se a P-100), para evitar a evaporação. Cada bateria de reações continha um controle negativo, com todos os componentes da reação, exceto o DNA, para verificar possíveis contaminações.

Foi adicionado às reações, Purified BSA (Bovine Serum Albumine), albumina de soro bovino. O BSA no ensaio RAPD, aparentemente, estabiliza a Taq polimerase protegendo-a de impurezas agregadas ao DNA genômico, bem como, de íons presentes na superfície de alguns tipos de plásticos utilizados na fabricação de microtubos (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

As reações foram amplificadas em termociclador MJ Research, Inc., modelo PTC-100TM; consistiram em uma etapa inicial de 95⁰C por 1 minuto seguida de 35 ciclos. Cada ciclo com 94⁰C por 10 segundos, 36⁰C por 1 minuto e 72⁰C por 2 minutos e 1 ciclo de 72⁰C por 7 minutos.

Tabela 3: "Primers" utilizados com suas respectivas sequências de nucleotídeos.

Primer	Sequência (5'→3')
OPX-02	TTCCGCCACC
OPX-06	ACGCCAGAGG
OPX-13	ACGGGAGCAA
OPX-14	ACAGGTGCTG
OPX-15	CAGACAAGCC
OPT-07	GGCAGGCTGT
OPY-05	GGCTGCGACA

4.3.4. SEPARAÇÃO E VISUALIZAÇÃO DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS

Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em géis de agarose 1,2%, preparados de acordo com SAMBROOK *et al.* (1989) e submetidos à eletroforese a 120 volts por aproximadamente duas horas em tampão TBE 0,5 X (Tris-Borato 0,045M e EDTA 0,001M). O corante brometo de etídio foi diluído no gel a uma concentração de 0,5 µg/ml de gel.

A cada 13 µl da amostra foi adicionado um tampão de carregamento (azul de bromofenol 3,61M, xileno cianol 4,64M, sacarose 1,17M e EDTA 0,1M pH 8) na proporção de 5:1, respectivamente. Os géis foram visualizados em transiluminador UV e fotografados em VDS (Video Documentation System), da Pharmacia Biotech usando filtro laranja.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi utilizado o programa STATISTICA STATSOFT para a realização das análises estatísticas.

Montou-se uma matriz binária de acordo com a presença (1) e ausência (0) de bandas reproduzíveis e mais intensas. A matriz gerada foi usada para o cálculo das distâncias genéticas e análise de “cluster”. As distâncias genéticas foram calculadas pelo método de Porcentagem de Desacordo, com base em PUTERKA *et al.* (1993), através da fórmula $(PD) = N_{AB}/N_T$, onde N_{AB} é o número total de bandas polimórficas entre os dois genótipos comparados e N_T , o número de bandas. A análise de cluster foi feita pelo método não-ponderado de agrupamento aos pares (UPGMA – Unweighted pair-group method using arithmetic averages), utilizando médias aritméticas que agrupa, inicialmente, indivíduos mais similares e assim, sucessivamente, até os indivíduos ou grupos mais distantes.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. SELEÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DAS CEPAS DE *B. thuringiensis*

Das 314 cepas extraídas de solos da região do Triângulo Mineiro, 134 obtiveram crescimento bacteriano que caracterizaram-as como *Bacillus thuringiensis* através de seu aspecto morfológico, principalmente devido a presença do cristal protéico e do esporo (Tabela 4). As amostras que não apresentaram características típicas de *B. thuringiensis*, que estavam contaminadas ou que não obtiveram crescimento em placas de petri contendo meio de cultura com penicilina G, foram descartadas. A figura 6 apresenta colônia de *B. thuringiensis* em microscópio de contraste de fase, utilizando-se lente de 40 vezes de aumento.

As cepas selecionadas foram encontradas nas localidades indicadas no mapa do Triângulo Mineiro (Figura 7).

Tabela 4: Relação entre a identificação da cepa e cidade de origem

N.	Cidade	N.	Cidade	N.	Cidade
1	Monte Carmelo	46	Araguari	91	Capinópolis
2	Monte Carmelo	47	Araguari	92	Capinópolis
3	Monte Carmelo	48	Campina Verde	93	Capinópolis
4	Uberlândia	49	Araguari	94	Uberlândia
5	Uberlândia	50	Araguari	95	Uberlândia
6	Uberlândia	51	Araguari	96	Uberlândia
7	Uberlândia	52	Araguari	97	Monte Alegre
8	Uberlândia	53	Tupaciguara	98	Santa Juliana
9	Uberlândia	54	Monte Alegre	99	Santa Juliana
10	Uberlândia	55	Uberlândia	100	Indianópolis
11	Uberlândia	56	Uberlândia	101	Nova Ponte
12	Uberlândia	57	Grupiara	102	Uberlândia
13	Uberlândia	58	Uberlândia	103	Uberlândia
14	Uberlândia	59	Uberlândia	104	Uberlândia
15	Monte Alegre	60	Tupaciguara	105	Uberlândia
16	Monte Alegre	61	Uberaba	106	Uberlândia
17	Monte Alegre	62	Monte Alegre	107	Uberlândia
18	Uberlândia	63	Monte Alegre	108	Tupaciguara
19	Uberlândia	64	Monte Alegre	109	Tupaciguara
20	Tupaciguara	65	Monte Alegre	110	Tupaciguara
21	Tupaciguara	66	Monte Alegre	111	Canápolis
22	Tupaciguara	67	Monte Alegre	112	Canápolis
23	Uberlândia	68	Monte Alegre	113	Canápolis
24	Uberlândia	69	Monte Alegre	114	Canápolis
25	Uberlândia	70	Uberlândia	115	São Francisco Sales
26	Uberlândia	71	Uberlândia	116	Uberlândia
27	Monte Alegre	72	Uberlândia	117	Uberlândia
28	Uberlândia	73	Uberlândia	118	Uberlândia
29	Tupaciguara	74	Uberlândia	119	Uberlândia
30	Tupaciguara	75	Uberlândia	120	Uberlândia
31	Uberlândia	76	Uberlândia	121	Uberlândia
32	Limoeiro D'Oeste	77	Uberlândia	122	Uberlândia
33	Prata	78	Uberlândia	123	Uberlândia
34	Uberlândia	79	Uberlândia	124	Uberlândia
35	Tupaciguara	80	Uberlândia	125	Monte Alegre
36	Uberlândia	81	Uberlândia	126	Monte Alegre
37	Monte Alegre	82	Uberlândia	127	Prata
38	Monte Alegre	83	Uberlândia	128	Uberlândia
39	Monte Alegre	84	Uberlândia	129	Uberlândia
40	Monte Alegre	85	Uberlândia	130	Uberlândia
41	Gurinhatã	86	Uberlândia	131	Uberlândia
42	Araguari	87	Uberlândia	132	Cascalho Rico
43	Araguari	88	Uberlândia	133	Uberlândia
44	Araguari	89	Uberlândia	134	Uberlândia
45	Araguari	90	Uberlândia		

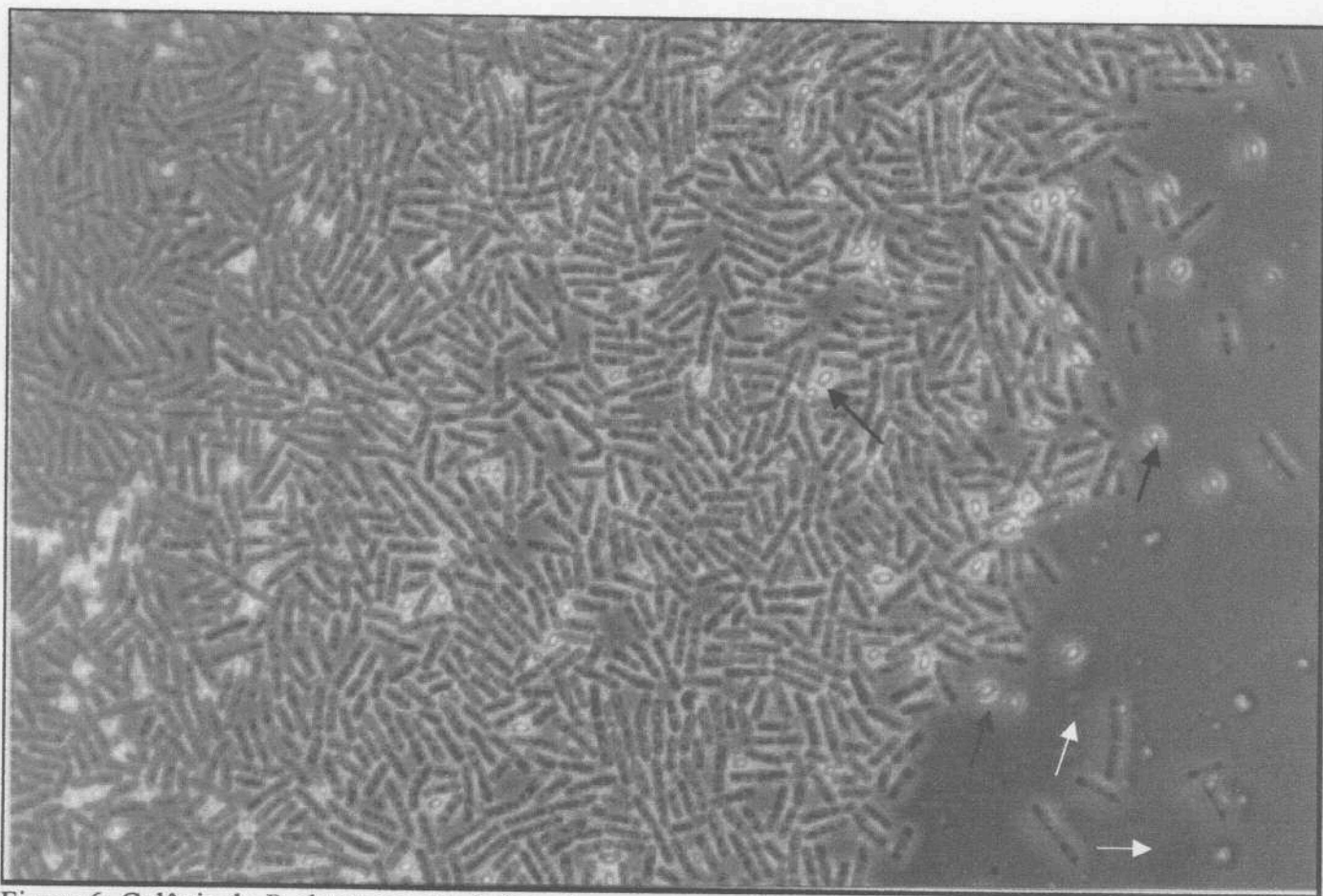


Figura 6: Colônia de *B. thuringiensis*, indicando nas setas pretas o esporo e nas setas brancas o cristal.



Figura 7: Mapa do Triângulo Mineiro indicando as cidades onde foram extraídas as cepas de *B. thuringiensis*

6.2. TESTE DE PATOGENICIDADE

Nos testes de patogenicidade empregados em 134 amostras de *B. thuringiensis*, as larvas neonatas de *Spodoptera frugiperda* apresentaram mortalidade variando de 0 a 26%, (Tabela 5).

Foi observado nos experimentos que a maioria das cepas que obteve mortalidade de 0%, apresentava um retardo acentuado em seu desenvolvimento, comparando-se com outra larva não infectada de mesmo período de vida. Esse

fato indica que esse retardo pode estar relacionado com a parada alimentar, e nos bioensaios, tanto a mortalidade como a parada alimentar, podem ser usadas como critérios de avaliação segundo (HABIB & ANDRADE, 1986). As características das larvas que sofreram mortalidade estão de acordo com HABIB & ANDRADE (1998), ou seja, coloração fosca do tegumento em função da invasão do patógeno na hemolinfa, e após a morte a larva adquire coloração preta.

A causa da diferença na susceptibilidade está no espectro de atividade da δ -endotoxina. O grau de toxicidade da δ -endotoxina varia em diferentes cepas. Esta variação pode ocorrer dentro de uma mesma espécie de inseto, diferenciando-se no grau de patogenicidade, ou mesmo, cepas que são eficientes para uma determinada espécie podem não ser ativas sobre outras (DULMAGE, 1980).

As cepas que obtiveram maior porcentagem de mortalidade para larvas neonatas de *Spodoptera frugiperda*, estavam situadas em Uberlândia e nas cidades próximas, mais especificamente em Monte Alegre, Tupaciguara e Capinópolis.

Tabela 5: Relação do número, mortalidade (%) e origem de cada cepa.

N.	Mort. (%)	Cidade	N.	Mort. (%)	Cidade
1	9	Monte Carmelo	48	0	Campina Verde
2	5,9	Monte Carmelo	49	0	Araguari
3	4,3	Monte Carmelo	50	0	Araguari
4	21,7	Uberlândia	51	0	Araguari
5	0	Uberlândia	52	4,2	Araguari
6	8,3	Uberlândia	53	0	Tupaciguara
7	8,3	Uberlândia	54	4,2	Monte Alegre
8	9,5	Uberlândia	55	0	Uberlândia
9	10,5	Uberlândia	56	0	Uberlândia
10	0	Uberlândia	57	0	Grupiara
11	4,5	Uberlândia	58	0	Uberlândia
12	16,7	Uberlândia	59	5,3	Uberlândia
13	0	Uberlândia	60	4,2	Tupaciguara
14	16,7	Uberlândia	61	8,7	Uberaba
15	4,5	Monte Alegre	62	12,5	Monte Alegre
16	0	Monte Alegre	63	4,8	Monte Alegre
17	13	Monte Alegre	64	0	Monte Alegre
18	0	Uberlândia	65	0	Monte Alegre
19	0	Uberlândia	66	4,2	Monte Alegre
20	8,7	Tupaciguara	67	4,3	Monte Alegre
21	0	Tupaciguara	71	5,5	Uberlândia
22	0	Tupaciguara	72	0	Uberlândia
23	0	Uberlândia	73	4,2	Uberlândia
24	4,3	Uberlândia	74	0	Uberlândia
25	9	Uberlândia	75	26	Uberlândia
26	8,7	Uberlândia	76	0	Uberlândia
27	8,7	Monte Alegre	77	15,8	Uberlândia
28	4,2	Uberlândia	78	0	Uberlândia
29	8,7	Tupaciguara	79	10	Uberlândia
30	9	Tupaciguara	80	0	Uberlândia
31	5,9	Uberlândia	81	0	Uberlândia
32	0	Limoeiro D'Oeste	82	12,5	Uberlândia
33	0	Prata	83	4,2	Uberlândia
34	4,3	Uberlândia	84	13,3	Uberlândia
35	16,7	Tupaciguara	85	0	Uberlândia
36	13,6	Uberlândia	86	0	Uberlândia
37	12,5	Monte Alegre	87	16,7	Uberlândia
38	9	Monte Alegre	88	4,3	Uberlândia
39	0	Monte Alegre	89	8,3	Uberlândia
40	0	Monte Alegre	90	0	Uberlândia
41	0	Gurinhatã	91	8,3	Capinópolis
42	4,3	Araguari	92	20,9	Capinópolis
43	4,2	Araguari	93	8,3	Capinópolis
44	8,3	Araguari	94	4,3	Uberlândia
45	0	Araguari	95	4,2	Uberlândia
46	4,2	Araguari	96	0	Uberlândia
47	13	Araguari	97	25	Monte Alegre

N.	Mort. (%)	Cidade	N.	Mort. (%)	Cidade
98	4,2	Santa Juliana	117	4,2	Uberlândia
99	0	Santa Juliana	118	0	Uberlândia
100	4,2	Indianópolis	119	12,5	Uberlândia
101	4,5	Nova Ponte	120	12,5	Uberlândia
102	8,3	Uberlândia	121	4,2	Uberlândia
103	8,7	Uberlândia	122	0	Uberlândia
104	4,2	Uberlândia	123	8,4	Uberlândia
105	13,6	Uberlândia	124	0	Uberlândia
106	0	Uberlândia	125	0	Monte Alegre
107	0	Uberlândia	126	12,5	Monte Alegre
108	8,7	Tupaciguara	127	0	Prata
109	13	Tupaciguara	128	8,4	Uberlândia
110	4,2	Tupaciguara	129	4,2	Uberlândia
111	0	Canápolis	130	0	Uberlândia
112	8,3	Canápolis	131	4,3	Uberlândia
113	0	Canápolis	132	0	Cascalho Rico
114	0	Canápolis	133	0	Uberlândia
115	0	São Francisco Sales	134	0	Uberlândia
116	0	Uberlândia			

6.3. DETERMINAÇÃO DE POLIMORFISMOS POR RAPD-PCR

Levou-se em consideração apenas as bandas intensas e bem definidas na análise para a montagem da matriz das distâncias, para evitar erros advindos da contagem incorreta de produtos amplificados fracamente (OLIVEIRA, 1998).

Para a utilização desta técnica, foi realizado uma seleção de cepas de *B. thuringiensis* de acordo com o percentual de mortalidade obtido, enquadrando-se quatro cepas (separadas aleatoriamente), a cada intervalo de 0 a 10%, 10 a 20% e 20 a 30%, (Tabela 6).

Obtiveram-se através da adição da albumina de soro bovino (BSA), ampliações mais intensas e homogêneas (Figura 8).

As reações amplificadas de DNA, por meio de 7 "primers" entre as 15 amostras de *B. thuringiensis*, incluindo as amostras-padrão para Lepidoptera, Diptera e Coleoptera, resultaram em 151 bandas amplificadas, sendo 2

monomórficas e 149 polimórficas. O tamanho dos fragmentos variou entre 30 e 7126 pb (Tabela 7).

Tabela 6: Relação da mortalidade (%) e cepas utilizadas na técnica RAPD

0-10%	10-20%	20-30%
100	12	4
101	14	75
112	47	92
115	109	97

Tabela 7: Relação entre “primers”, número de bandas polimórficas e monomórficas e o tamanho dos seus fragmentos

Primer	Bandas Polimórficas	Bandas Monomórficas	Tamanho do Fragmento (pb)
OPX-02	09	01	400 – 3300
OPX-06	14	00	250 – 3900
OPX-13	23	01	30 – 3600
OPX-14	17	00	298 – 3054
OPX-15	17	00	506 – 7126
OPT-07	32	00	201 – 3300
OPY-05	37	00	134 - 4000
Total	149	02	

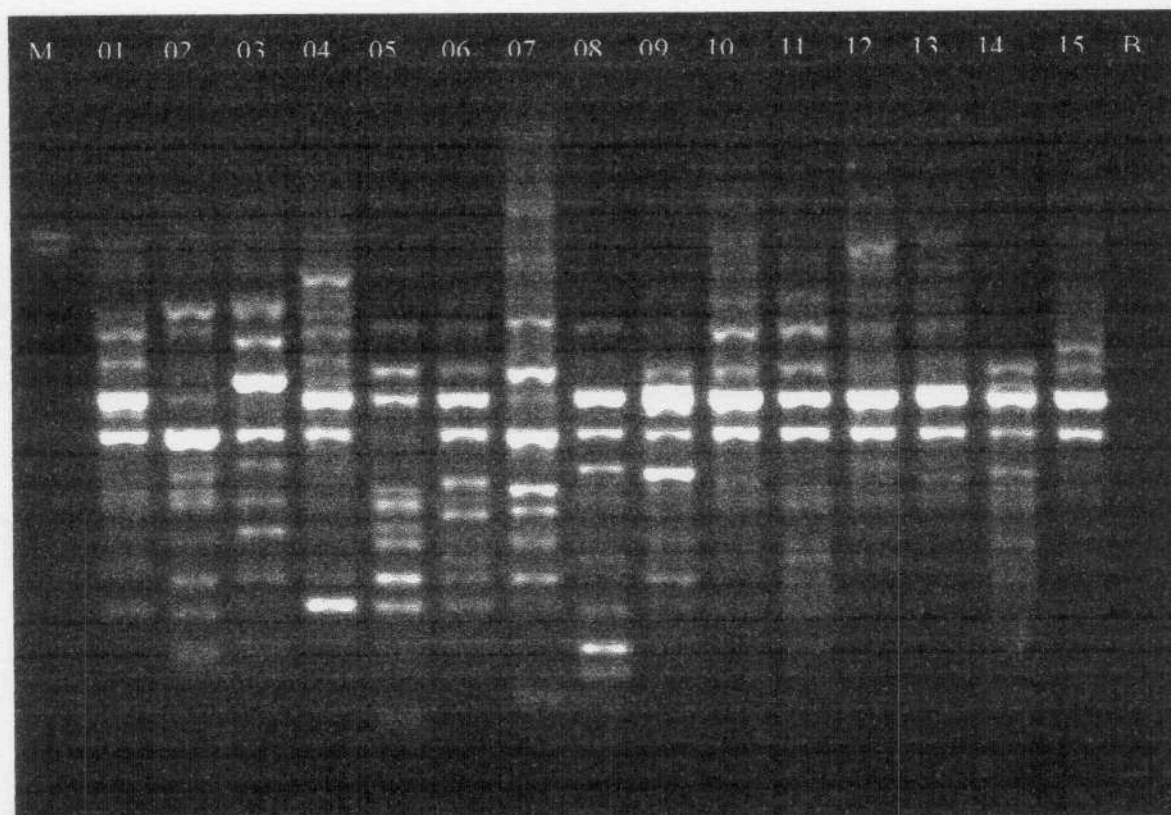


Figura 8: Padrão de amplificação do “primer” OPX-13. M – Marcador, 01 – Cepa Purdue, 02 – Cepa HD27, 03 – Cepa Fio 584, 04 a 15 – *B. thuringiensis* amostrados na região do Triângulo Mineiro, B – Branco

No dendrograma (Figura 9) resultante de todos os “primers”, ao nível de 22% de dissimilaridade genética, houve um agrupamento de 9 das 12 cepas da região do Triângulo Mineiro em um grupo específico. Este grupo está mais próximo geneticamente, tanto da cepa de *B. thuringiensis* HD27, específica para Lepidoptera (2), quanto da cepa Fio 584(3), específica para Diptera. Dentre as cepas utilizadas como padrão, a cepa 1, específica para Coleoptera, é a mais distante.

Após a reunião dos dados obtidos com os sete “primers” utilizados, totalizaram-se 149 marcadores, com uma média de 21,3 polimorfismos por “primer”. Percebe-se através deste resultado, o alto grau de variabilidade desta espécie.

Na matriz das distâncias genéticas (Figura 10), pode-se notar que não houve associação entre o agrupamento das cepas quanto ao perfil de RAPD e a porcentagem de mortalidade estabelecida em intervalos de 10, 20 e 30%. As cepas 92 e 47 são as mais próximas geneticamente (15%) entre si, e a porcentagem de mortalidade em *Spodoptera frugiperda* resultou em 20,9 e 13 respectivamente. Enquanto que as cepas 92 (20,9%) e 97 (25%), que se enquadram no mesmo intervalo de porcentagem de mortalidade (20 a 30%), estão distantes geneticamente em 40%. A maior distância genética foi de 42%, entre a cepa 2 (HD27 – específica para Lepidoptera) e a cepa 92 (Monte Alegre). Este fato enfatiza que apesar da distância genética entre as cepas ter sido a maior encontrada, ambas agem sobre larvas de Lepidoptera. Já que a cepa 92 possui uma eficiência de mortalidade em larvas neonatas de *Spodoptera frugiperda* de 20,9%. Uma vez que a grande maioria dos genes para toxinas é extracromossômica, encontrando-se em plasmídios, novas combinações de toxinas podem surgir naturalmente graças à transferência dessas partículas entre as diferentes linhagens, (HABIB & ANDRADE, 1998). E a menor distância (15%) ficou entre as cepas 4(Uberlândia) e 14(Uberlândia) e as cepas 92 (Monte Alegre) e 47 (Araguari) que se encontram a aproximadamente 24% do grupo mais próximo da cepa 2, reconhecidamente específica para Lepidoptera.

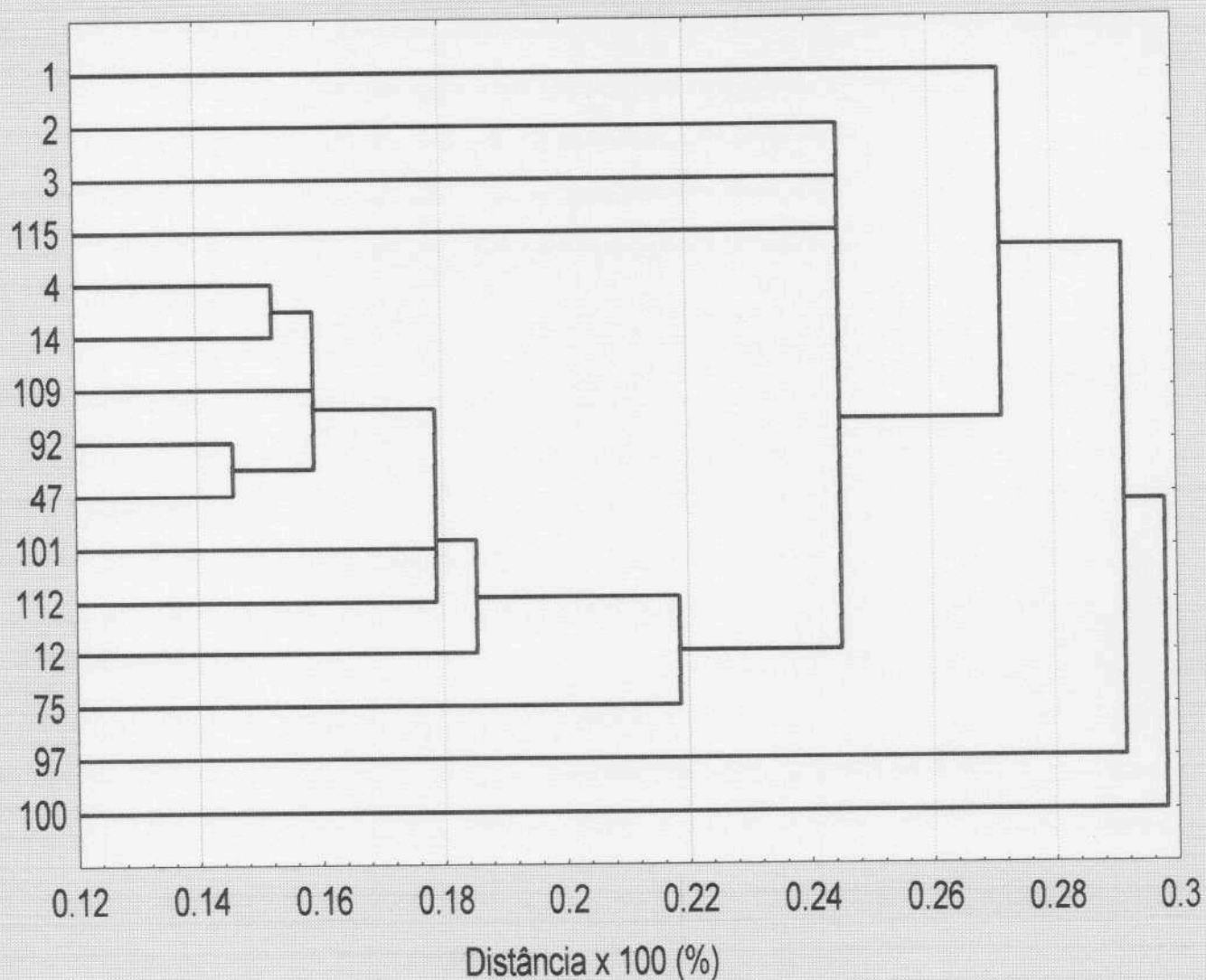


Figura 9: Dendrograma representativo da distância genética por Porcentagem de Desacordo e Agrupamento pelo método de UPGMA entre os 15 genótipos (12 amostras do Triângulo Mineiro e 3 padrões de *B. thuringiensis*) por meio de 149 marcadores RAPD obtidos por 7 "primers" curtos. As amostras 1, 2 e 3 abrigam os genes para Coleoptera, Lepidoptera e Diptera, respectivamente

	1	2	3	100	115	4	97	101	12	112	14	92	47	75	109
1	0,00														
2	0,27	0,00													
3	0,30	0,25	0,00												
100	0,34	0,38	0,36	0,00											
115	0,31	0,28	0,25	0,34	0,00										
4	0,30	0,26	0,27	0,34	0,25	0,00									
97	0,39	0,42	0,40	0,40	0,33	0,29	0,00								
101	0,29	0,27	0,28	0,31	0,25	0,18	0,35	0,00							
12	0,35	0,34	0,31	0,38	0,32	0,19	0,36	0,25	0,00						
112	0,28	0,33	0,31	0,37	0,32	0,26	0,32	0,28	0,29	0,00					
14	0,29	0,31	0,26	0,30	0,26	0,15	0,32	0,19	0,22	0,23	0,00				
92	0,33	0,32	0,32	0,32	0,35	0,31	0,40	0,28	0,32	0,23	0,26	0,00			
47	0,30	0,35	0,29	0,34	0,31	0,28	0,39	0,24	0,30	0,21	0,25	0,15	0,00		
75	0,28	0,30	0,26	0,38	0,27	0,22	0,39	0,28	0,22	0,27	0,24	0,29	0,26	0,00	
109	0,28	0,35	0,28	0,30	0,28	0,22	0,34	0,24	0,28	0,18	0,16	0,23	0,16	0,26	0,00

Figura 10: Matriz das distâncias genéticas expressa em Porcentagem de Desacordo, obtida para 3 genótipos de *B. thuringiensis* (Purdue, HD27 e Fio 584) e 12 genótipos da região do Triângulo Mineiro por meio de 149 marcadores RAPD, gerados por 7 "primers" curtos.

As cepas sombreadas correspondem a maior e menores distâncias genéticas.

7. CONCLUSÕES

- Foram mapeadas e isoladas cepas de *Bacillus thuringiensis* de solos de várias localidades da região do Triângulo Mineiro, evidenciando uma vasta distribuição desta bactéria;
- Foram efetuados testes de patogenicidade em 134 cepas de *B. thuringiensis*, obtendo-se porcentagem de mortalidade em larvas neonatas de *Spodoptera frugiperda* de 0 a 26 %;
- Houve uma alta variabilidade entre as cepas, obtida com uma média de 21,3 polimorfismos por “primer”.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANGUS, T. A. A bacterial toxin paralysing silkworm larvae. **Nature**, London, 1954. 173, p. 545-546.
- ANGUS, T. A. General characteristics of certain insect pathogens related to *B. cereus* Frankland y Frankland. **Canadian J. Microbiol.**, 1956 a. 2, p. 111-1121.
- ANGUS, T. A. Association of toxicity with protein - crystalline inclusions of *Bacillus sotto* Ishiwata. **Canadian J. Microbiol.**, 1956b. 2, p. 122-131.
- ANGUS, T. A. Extraction, purification and properties of *Bacillus sotto* toxin.- **Canadian J. Microbiol.**, 1956c. 2, p. 416-426.
- AOKI, CHIGASAKI. **Über die pathogenität der sog. sotto-Bacillen (Ishawata) bei Seidenraupen. Mitt. Med. Fak. Kais. Univ. Tokio**, 1915. 13, p. 419-440.
- ARONSON, A. I.; BECKMAN, W. and DUNN, P. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. **Microbiol. Rev.** 1986. 50, p. 1-24.

- AZEVEDO, J. L. Engenharia genética aplicada ao controle microbiano de insetos. In: ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. p. Piracicaba, Editora Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 1998, 1163 p.
- AZEVEDO, J. L. Controle microbiano de insetos - pragas e seu melhoramento genético. In: MELO, I. S. e AZEVEDO, J. L. **Controle Biológico**. v. 1, 1998a, 262 p.
- BERLINER, E. **Über die Schlaffsucht der Mehlmottenraupe**. Z. Gesamte Getreidewsen Berlin, 1911. 3, p. 63-70.
- BERLINER, E. **Über die Schlaffsucht der Mehlmottenraupe**. Z. Ang. Entomol., 1915. 2, p. 29-56.
- BLENK, R. G. *et al.* Bacterial genes. **International patent application**, 1989. PCT/GB90/00706.
- BOHRINGER MANNHEIM BIOCHEMICA. **PCR applications manual**. Boehringer Mannheim, 1995, 192 p.
- BOHOROVA, N.; CABRERA, M.; ABARCA, C. *et al.* Susceptibility of Four Tropical Lepidopteran Maize Pests to *Bacillus thuringiensis* CryI- Type Insecticidal Toxins. **J. Econ. Entomol.** , April/1997. 90(2): 412-415
- BORGES, M. **Marcadores Moleculares e seus Efeitos sobre Características Quantitativas do Bovinos de Corte**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Uberlândia, 1997, 119 p.

- CAPALBO, D. M. F. **Controle microbiano de pragas através de *Bacillus thuringiensis***. Palestra proferida no III curso de Controle Microbiano de Pragas de Caupi e Feijão- CNPAF, Goiânia-GO, 1986.
- CAPALBO, D. M. F. e MORAES, I. O. Produção de inseticida biológico com *Bacillus thuringiensis*, **Boletim de Pesquisa** n. 1. Jaguariuna, S. P., 1987. 15P.
- CARVALHO, R. P. L. **Danos, flutuação de população, controle e comportamento de *Spodoptera frugiperda* e susceptibilidade de diferentes genótipos de milho em condições de campo**. Piracicaba, SP: ESALQ, 1970, 170p. (Tese de Doutorado).
- CRUZ, I. **A lagarta-do-cartucho na cultura do milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA/CNPMS, 1995, p.45. (EMBRAPA/CNPMS. Circular Técnica, 21).
- DE BARJAC, H e BONNEFOI, A. Essai de classification biochemique et serologique de 24 souches de *Bacillus* du type *Bacillus thuringiensis*. **Entomophaga**, 1962. 7, p. 5-31.
- DULMAGE, H. T. Insecticidal activity of HD- 1, a new isolate of *Bacillus thuringiensis* var. *alesti*. **J. Invert. Pathol.**, 1970. 15, p. 232-239.
- DULMAGE, H. T. and COOPERADORES. Insecticidal activity of isolates of *Bacillus thuringiensis* and their potential for pest control. In: BURGESS, H. D., ed. **Microbial Control of pests and plant diseases**. London. Academic Press, 1970-1980. P. 193-222.
- ELY, S. The engineering of plants to express *Bacillus thuringiensis*. In: ENTWISTLE, P. F.; CORY, J. S.; BAILEY, M. J. and HIGGS, S. ***Bacillus thuringiensis*, and environmental biopesticide: Theory and Practice**. New York: John Wiley e Sons, 1993. P. 105- 124.

- FERRAZ, M. C. V. D. **Determinação das exigências térmicas de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera, Noctuidae) em cultura de milho.** Piracicaba, ESALQ, 1982. 81p. (Dissertação, Mestrado).
- FERREIRA, M. E. e GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** 3^a ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. p. 220. (EMBRAPA-CENARGEN Documento 20)
- GELERNTER, W. and SCHWAB, G. E. Transgenic bacteria, viruses, algae and other microorganisms as *Bacillus thuringiensis* toxin delivery systems. In: ENTWISTLE, P. F.; CORY, J. S.; BAILEY, M. J. and HIGGS, S. ***Bacillus thuringiensis* and environmental biopesticide: Theory and Practice.** New York: John Wiley e Sons, 1993. P. 89-104.
- GOLDBERG, L. J. and MARGALIT, J. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. **Mosq. News**, 1977. 37, p. 355-358.
- HABIB, M. E. M. e ANDRADE, C. F. S. Bactérias Entomopatogênicas. In: ALVES, S. B. **Controle Microbiano de Insetos.** São Paulo: Manole LTDA, 1986. 407p. p. 127-170.
- HABIB, M. E. M. e ANDRADE, C. F. S. Bactérias Entomopatogênicas. In: ALVES, S. B. **Controle Microbiano de Insetos.** 2 ed. FEALQ, Piracicaba, SP. 1998.
- HANNAY, C. L. Crystalline inclusions in aerobic spore-forming bacteria. **Nature.** London, 1953. 172, p. 1004.

- HOFTE, H. and WHITELEY, H. R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiol. Revis.**, 1989. 53, p. 242-255.
- ISHAWATA, S. **On a Kind of severe flacherie (sotto disease)**. Dainihon Sanshi Kahio, 1901. 114, p. 1-5.
- KRIEG, A. *et al.* *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*: Ein neuer, gegenüber Larven von Coleopteren wirksamer Pathotyp. **Z. Ang. Entomol.**; 1983. 96, p. 500-508.
- KRYWIENCZYK, J.; DULMAGE, H. T., FAST and P. G. Occurrence of two serologically distinct groups with *Bacillus thuringiensis* serotype 3a, b var. *Kurstaki*. **J. Invertebr. Pathol.**, 1978. 31, p. 372-375
- MARTIN, P. A. W. and TRAVERS, R. S. Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. **Appl. Env. Microbiol.**, 1989. 55, p. 2437-2442.
- MEUNIER, J. R. and GRIMONT, P. A. D. Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. **Res. Microbiol.** 1993. 144: 373 – 379
- NAVON, A. Control of Lepidopteran pests with *Bacillus thuringiensis*. In: ENTWISTLE, P. F.; CORY, J. S.; BAILEY, M. J. and HIGGS, S. ***Bacillus thuringiensis* an environmental bropesticide: Theory and Practice**. New York: John Wiley e Sons, 1993. p. 125-146.
- OLIVEIRA, R. C. **Divergência Genética por Marcadores RAPD em *Tetragonisca angustula* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae)**, Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Uberlândia, 1998. 50p.

- PUTERKA, G. J.; BLACK IV, W. C.; STEINER, W. M. and BURTON, R. L. Genetic variation and phylogenetic relationships among worldwide collections of the Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia* (Mordvilko), inferred from allozyme and RAPD-PCR markers **Heredity**. 1993. p.604-618.
- RAUN, E. S.; SUTTER, E. R. and REVELO, M. A. Ecological factors affecting the pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* the European corn borers and fall armyworm. **J. Invert. Pathol.**, 1966. 8, p. 365-375.
- RICKWOOD, D. and HAMES, B. D. **Gel electrophoresis of nucleic acids. A Practical Approach**, second edition, IRL PRESS at Oxford University Press, 1990.
- ROUX, K. H. Optimization and troubleshooting in PCR. **PCR Methods and Applications**, 1995, 4 (5): S185 - S194.
- SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STOEFFEL, S.; SHCARF, S. J.; HIGUCHI, G. T.; MULLIS, K. B. and ERLICH, H. A. Primer – directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**. 1988. 239: p. 487-491 apud CUNHA, W. V. **Mapeamento Geográfico da Ocorrência de Cepas de *Bacillus thuringiensis* no Triângulo Mineiro e sua Caracterização Molecular**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Uberlândia, 1999, 44p.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F. and MANIATIS, T. **Molecular cloning: laboratory manual**. 2. Ed. CSHL, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- SCHIERWATER, B. and ENDER, A. Different thermostable DNA polymerases may amplify different RAPD products. **Nucl. Acid. Res.** 1993. 21: 4647 - 4648.
- SHARPE, E. S. and BAKER, F. L. UI HD-1 isolate of *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki*. **J. Invertebr. Pathol.** 1979. 34, p. 320-322.

- SMITH, R. A. and COUCH, G. A. The phylloplane as a source of *Bacillus thuringiensis* variants. **Appl. Env. Microbiol.**, 1991. 57, p. 311-315.
- SOLLER, M. Genetic mapping of the bovine genome using deoxyribonucleic acid-level markers to identify loci affecting quantitative traits of economic importance. **Journal of Dairy Science**, 1990. 73: 2628 - 2646.
- STEINHAUS, E. A. The importance of environmental factors, in the insect microbe ecosystem. **Bacterol. Revis.**, 1960. 24, p. 365-373.
- TAILOR, R.; TIPPET, J.; GIBB, G.; PELLIS, S.; PIKE, D.; JORDAN, L. and ELY, S. L. Identification and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins entomocidal to coleopteran and lepidopteran larvae. **Molecular Microbiology**. 1992. n.9, p.1211-1217.
- TOJO, A. *et al.* Effects of the three proteases from gut juice of the silkworm *Bombyx mori*, on the two morphologically different inclusions of δ -endotoxin produced by *Bacillus thuringiensis* *Kurstaki* HD-1 strain. **Agric. Biol. Chem.**, 1986. 50, p. 575-580.
- VALADARES-INGLIS, M. C.; SHILER, W.; DE-SOUZA, M. T. Engenharia genética de microrganismos agentes de controle biológico. In: MELO, I. S. e AZEVEDO, J. L. **Controle Biológico**. 1998. 262p.
- YAMAMOTO, T. and McLAUGHLIN, R. E. Isolation of a protein from the parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki* toxin to the mosquito larva *Aedes taeniorhynchus*. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, 1981. 103, p. 414-421.
- WHITE, T. J.; ARNHEIM, N. and ERLICH, H. A. The polymerase chain reaction. **Technical focus**, 1989. 5 (6): 185 - 188.