

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

110-
13.119
0.000,
11.000.000

**MAPEAMENTO GEOGRÁFICO DA OCORRÊNCIA DE CEPAS DE *BACILLUS THURINGIENSIS* NO
TRIÂNGULO MINEIRO E SUA CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR**

WALTER VIEIRA DA CUNHA

ORIENTADOR

LUIZ RICARDO GOULART FILHO

**DISSERTAÇÃO APRESENTADA À UNIVERSIDADE
FEDERAL DE UBERLÂNDIA COMO PARTE DAS
EXIGÊNCIAS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE
MESTRE EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA, ÁREA DE
CONCENTRAÇÃO GENÉTICA**

DIRBI/UFU



1000187158

UBERLÂNDIA – MG

MARÇO - 1999

DEDICO:

À MINHA MÃE, QUE ESTEVE DO MEU LADO EM TODOS ESTES ANOS DE ESTUDOS, ME APOIANDO, APESAR DE TODAS AS DIFICULDADES E ME FORTALECENDO NAS METAS QUE BUSQUEI ALCANÇAR.

AO MEU FALECIDO PAI, QUE NA SUA SIMPLICIDADE, SEMPRE SE ESFORÇOU PARA QUE NUNCA FALTASSE O ESTUDO EM MINHA VIDA, MESMO PRECISANDO DE MIM EM SEUS AFAZERES ÁRDUOS DO DIA-A-DIA DO HOMEM DO CAMPO.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, PELA VIDA E PELA LIBERDADE DE DECIDIRMOS NOSSOS DESTINOS

AO PROFESSOR DR. LUIZ RICARDO GOULART FILHO, VERDADEIRO ESPÍRITO DE OTIMISMO, QUE SEMPRE DEPOSITOU GRANDE CONFIANÇA EM MIM, ME ORIENTANDO DURANTE MINHA ESTADIA NA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA.

A BÁRBARA A. A. SANTANA, QUE NÃO MEDIU ESFORÇOS, SE DEDICANDO INTEGRALMENTE PARA A EXECUÇÃO DESTE TRABALHO, SACRIFICANDO MUITAS VEZES SEU DESCANSO PARA ME AJUDAR.

AO PROFESSOR DR. JAIRO ROBERTO MENDONÇA LYRA PELO AUXÍLIO E POR TER COLOCADO A DISPOSIÇÃO O LABORATÓRIO DE CONTROLE BIOLÓGICO

AO PROF. DR. FERNANDO CESAR JULIATTI, POR TER ACEITADO PARTICIPAR DESTA BANCA EXAMINADORA.

A WANESSA ALTIMIRAS COSTA PELA DISPONIBILIDADE EM SE DESLOCAR ATÉ O CNPMS, PARA EXECUTAR PARTE DOS TRABALHOS.

AO MSc. FERNANDO HERCOS VALICENTE, PELAS SUGESTÕES VIA E-MAIL.

AO AMIGO CÍCERO DOZINETE PEREIRA, PELO COMPANHEIRISMO E PELA FORÇA QUE TRANSMITE A QUEM LHE RODEIA.

A TODOS OS COLEGAS DO LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR E GENÉTICA, PELAS DICAS MUITA DAS VEZES PRECIOSAS PARA O ANDAMENTO DO TRABALHO.

3.1.2. <i>Spodoptera frugiperda</i> (Lepidoptera: Noctuidae)	18
3.1.2.1. Preparo da dieta artificial	19
3.1.2.2. Testes de patogenicidade	20
3.2. Determinação da especificidade inseticida de <i>Bacillus thuringiensis</i> por PCR	20
3.3. Determinação de polimorfismos entre amostras de <i>Bacillus thuringiensis</i> utilizando RAPD-PCR	22
3.4. Análise Estatística	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	25
4.1. Seleção e identificação de cepas <i>Bacillus thuringiensis</i>	25
4.2. Testes de patogenicidade	26
4.3. Determinação da especificidade inseticida de <i>Bacillus thuringiensis</i> por PCR	28
4.4. Determinação de polimorfismos entre amostras de <i>Bacillus thuringiensis</i> utilizando RAPD-PCR	30
5. CONCLUSÕES	36
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

ABREVIações

μ l	Microlitro
μ m	Micrômetro
a. C.	Antes de Cristo
AFLP	Polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados
ATP	Adenosina Trifosfato
BSA	Albumina de soro bovino
cm	Centímetro
dATP	5'-desoxiadenosina trifosfato
dCTP	5'-desoxicitosina trifosfato
dGTP	5'-desoxiguanosina trifosfato
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dTTP	5'-desoxitimidina trifosfato
EDTA	Ácido etilendiaminotetra acético saldissódico
EtBr	Brometo de Etídio
g	Gramma
h	Hora
Kb	Kilobase
KCl	Cloreto de Potássio
l	Litro
M	Molar
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
min	Minuto(s)
MIP	Manejo Integrado de Pragas
ml	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro(s)
NaCl	Cloreto de Sódio
ng	Nanograma(s)
nm	Nanômetro(s)
°C	Graus Celsius
pb	Pares de base
PCR	Reação da Polimerase em Cadeia
pmol	Pico-mol
RAPD	Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso
RFLP	Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição
RNA	Ácido Ribonucléico
rpm	Rotações por minuto
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
U	Unidade(s) de enzima
UV	Ultra-violeta
V	Volts
VNTR	Sequências adjacentes que se repetem em número variável

LISTA DE FIGURAS

Figura	Descrição	Pág.
1	<i>Bacillus thuringiensis</i> apresentando na parte de cima, o esporo e em baixo, o cristal protéico	5
2	Mapa da localização na região do Triângulo Mineiro das cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i> selecionadas.	16
3	Avaliação de DNA em gel de agarose 1,2%. 1 – <i>Bacillus thuringiensis</i> var <i>thuringiensis</i> . 2 – 13 – Amostras coletadas no Triângulo Mineiro.	18
4	Otimização do primer Universal 1 específico para Lepidópteros. Condições: Primer (10pmol/μl) – 0,5 μl: canaletas 1, 3, 5, 7, 9, 11. 1,0 μl canaletas 2, 4, 6, 8, 10, 12. MgCl₂ (25mM) – 0,0 μl: canaletas 1, 2, 7, 8. 1,0 μl: canaletas 3, 4, 9, 10. 2,0 μl: canaletas 5, 6, 11, 12. Taq DNA polimerase (5U/μl) – 0,1 μl: canaletas 1 à 6. 0,2 μl: canaletas 7 à 12. dNTPs (60Mm) – 0,25 μl. Tampão (10x) – 2,5 μl. DNA (150,25 ng/μl) – 1,0 μl.	20
5	Teste de primers com amostras de <i>Bacillus thuringiensis</i> . 01 e 02 – GOU05, 03 e 04 – MAU 0801, 05 e 06 OPC09, 07e 08 - OPG15, 09 e 10 – OPG20, 11 e 12 – OPI05, 13 e 14 OPM07, 15 e 16 - OPM09, 17 e 18 - OPM12, 19 e 20 – OPM14, 21 e 22 – OPM18, 23 e 24 – OPM19, 25 e 26 – OPT05, 27 e 28 – OPT09 e 29 e 30 – OPX04.	23
6	Colônia <i>Bacillus thuringiensis</i> com setas indicando cristais dentro e fora da bactéria	25
7	Amplificação com <i>primer</i> Universal com especificidade para Coleópteros. M – Marcadores 01- <i>Bacillus thuringiensis</i> var <i>Thuringiensis</i> , 02 – <i>Bacillus thuringiensis</i> var <i>Isrraelensis</i> , 03 a 27 – <i>Bacillus thuringiensis</i> amostrados na região do Triângulo Mineiro, 28 – <i>Bacillus thuringiensis</i> var <i>Purdue</i> , B – Branco.	28
8	Amplificação com <i>primer</i> Universal específico para Lepidóptero utilizando as mesmas condições para ambos. M – Marcador, 01 <i>Bacillus thuringiensis</i> var <i>thuringiensis</i> (Extração de DNA), 02 – <i>Bacillus thuringiensis</i> var <i>thuringiensis</i> (Cultura líquida)	29
9	Padrão de amplificação do <i>primer</i> OPM14. 01 - <i>Bacillus thuringiensis</i> var <i>Thuringiensis</i> , 02 – <i>Bacillus thuringiensis</i> var <i>Isrraelensis</i> , 03 a 27 – <i>Bacillus thuringiensis</i> amostrados na região do Triângulo Mineiro, 28 – <i>Bacillus thuringiensis</i> var <i>Purdue</i> , B – Branco, M – Marcador	31
10	Dendrograma representativo da distância genética por Porcentagem de Desacordo e Agrupamento pelo método de UPGMA entre os 28 genótipos (25 amostras e 3 padrões de <i>Bacillus thuringiensis</i>) por meio de 189 marcadores RAPD obtidos por 13 <i>primers</i> decâmeros. As amostras C1, C2 e C28 abrigam os genes <i>cry</i> 1 (Lepidópteros), <i>cry</i> 4 (Dípteros) e <i>cry</i> 28 (Coleópteros) respectivamente	33
11	Matriz das distâncias genéticas expressa em Porcentagem de Desacordo, obtida para 03 cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i> (<i>thuringiensis</i> , <i>israelensis</i> e <i>purdue</i>) e 25 cepas amostradas na região do Triângulo Mineiro por meio de 189 marcadores RAPD, gerados por 13 <i>primers</i> decâmeros.	34

LISTA DE TABELAS

Tabela	Descrição	Página
1	Origem das 25 amostras avaliadas neste estudo e número de referência utilizado nas reações de PCR e RAPD.	17
2	Origem, gene e especificidade das 3 cepas utilizadas como padrão para análise de PCR	17
3	Nutrientes utilizados em dieta artificial de <i>Spodoptera frugiperda</i> .(Lepidóptera: Noctuídae)	19
4	Primers Universais utilizados na determinação da especificidade das amostras de <i>Bacillus thuringiensis</i>	21
5	<i>Primers</i> utilizados e suas respectivas sequências de nucleotídeos	22
6	Mortalidade (%) de larvas neonatas de <i>Spodoptera frugiperda</i> (Lepidóptera: Noctuídae) utilizadas em testes de patogenicidade com amostras coletadas no Triângulo Mineiro e a cepa padrão 01 específica para Lepidópteros.	27
7	pH do solo e mortalidade (%) das amostras retiradas da região do Triângulo Mineiro	27
8	Relação do número total de bandas amplificadas, monomórficas e tamanho estimado das bandas por primers para as cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	31

RESUMO

O uso indiscriminado de inseticidas orgânico sintético tem levado pesquisadores a desenvolver estratégias alternativas para o manejo de insetos pragas. Dentre estas, destaca-se o controle microbiano de insetos que tem sugerido uma utilização mais racional para o uso inseticidas no controle de insetos. Dos agentes utilizados no controle microbiano, as bactérias tem se destacado por várias características que favorecem a sua produção e manejo. Uma das bactérias mais utilizadas no controle de insetos é o *Bacillus thuringiensis* que apresenta uma carga de toxinas diversa, apresentando alta especificidade entre ordens de insetos bem como dentro da própria ordem. A busca de novas cepas com características desejáveis tais como maior abrangência de atuação e toxicidade alta para insetos pragas, tem levado pesquisadores a se utilizarem das ferramentas da Biologia Molecular com a intenção de agilizar este processo. Neste trabalho, comprovou-se a presença de *Bacillus thuringiensis* no Triângulo Mineiro por extração de amostras de solo, as quais apresentaram de 0 a 26% de mortalidade em *Spodoptera frugiperda* (Lepidóptera: Noctuídae). Utilizou-se então as técnicas PCR e RAPD para caracterização molecular destas cepas coletadas, com o objetivo de separá-las entre as ordens lepidóptera, coleóptera e díptera. Isto facilita a etapa de determinação do grau de toxicidade pois, com esta determinação, já se tem as ordens dos insetos alvos nos quais as cepas podem ser testadas. Para a técnica PCR foram utilizados *primers* específicos, desenhados a partir da região conservada do gene responsável pela codificação da proteína cristal. Estes *primers* não foram capazes de separar as cepas selecionadas da região do Triângulo Mineiro, identificando apenas as cepas utilizadas como controle. Passou-se então a análise de RAPD, onde se verificou um alto grau de variabilidade entre as amostras. Com 13 *primers* amplificando 189 marcadores polimórficos, construiu-se uma matriz com as distâncias genéticas, calculadas pelo método de Porcentagem de Desacordo. Montou-se um dendrograma pelo método não ponderado de agrupamento aos pares (UPGMA), onde ao nível de 29% pôde-se notar a separação em três grupos, sendo o primeiro formado pelas cepas mais próximas da cepa padrão específica para lepidópteros, um segundo formado por duas cepas coletadas nas regiões de Indianópolis - MG e Araguari - MG e o terceiro pela cepas padrão específica para dípteros.

1. INTRODUÇÃO

O uso indiscriminado de inseticidas orgânicos sintéticos desenvolvidos durante o último século tem colocado em risco a saúde humana e tem causado graves problemas ambientais. Preocupados com tais problemas, pesquisadores, tem desenvolvido estratégias alternativas para o manejo de insetos pragas e dentre elas o Manejo Integrado de Pragas (MIP) tem aberto uma visão mais racional sobre o uso de inseticidas e controle de pragas. O uso de microrganismos entomopatogênicos (controle microbiano) no controle destes insetos para o MIP representa um avanço para uma agricultura mais equilibrada com o meio ambiente, principalmente em países de clima tropical e com vastas áreas plantadas como é o caso do Brasil.

ALVES (1998), cita que os estudos em patologia de insetos tem registros de 2700 a.C. com os chineses e egípcios ao observarem doenças em bicho-da-seda e abelhas. A partir daí, descrições de patologias em insetos vem sendo registradas ao longo da história. Atualmente é grande o avanço científico da patologia de insetos, com a repercussão direta no campo do controle microbiano. O controle microbiano apresenta vantagens como especificidade, multiplicação e dispersão do patógeno no ambiente, controle mais duradouro, não poluentes. É importante mencionar que os microrganismos entomopatogênicos não devem ser considerados os únicos agentes de controle de insetos. Esse tipo de controle deverá fazer parte de um conjunto de medidas que, atuando em harmonia com o ambiente, seja capaz de reduzir a população dos insetos pragas a níveis não-econômicos.

Dos agentes utilizados no controle microbiano, destacam-se os fungos, vírus, nematóides, protozoários e bactérias.

De acordo com JUTSUM (1988), do ponto de vista comercial, o maior potencial para o controle microbiano reside na utilização de bactérias e fungos, os quais podem ter custo efetivo de produção comparável aos dos químicos disponíveis no mercado. Apesar de todos os benefícios, somente alguns biopesticidas têm sido empregados.

Atualmente, apenas 1% das pragas da agricultura e vetores transmissores de doenças é controlado por compostos originários de organismos vivos. Entretanto, em mais de 30 anos como agente de controle microbiano, o *Bacillus thuringiensis* é responsável por 90-95% desse mercado (VALADARES *et al.*, 1998).

A utilização do *Bacillus thuringiensis* no controle de insetos tem sido incrementado pelos avanços da engenharia genética. Os cristais tóxicos e os genes que codificam essas proteínas vêm sendo isolados e estudados quanto à regulação e expressão. O uso destas tecnologias tem facilitado a clonagem destes genes e sua expressão em plantas, em sementes e em bactérias de solo, providenciando novos caminhos para a toxina chegar até os insetos (GILL *et al.*, 1992).

Até o momento, os principais exemplos da utilização da engenharia genética, encontram-se na bactéria *Bacillus thuringiensis*. Vários genes de produção das toxinas responsáveis pela morte de insetos, localizados na maioria em elementos extracromossômicos, os plasmídeos, já foram clonados em *B. thuringiensis*, inclusive a partir de linhagens brasileiras (ARANTES *et al.*, 1990) e muitos já foram também sequenciados. Com esses dados, tentou-se transferir genes de produção de toxina para bactérias de solo, endofíticas (habitam o interior das plantas) e até mesmo para a própria planta com resultados desejáveis (THANABALU *et al.*, 1992).

As novas tecnologias estão contribuindo inclusive para produzir microrganismos potencialmente úteis no controle microbiano. O processo de melhoramento genético, visando produção de plantas transgênicas resistentes a insetos pela transferência de genes codificadores de toxinas provenientes de bactérias, já resultou em variedades comercializáveis, embora surjam problemas de resistência dos insetos às toxinas (AZEVEDO, 1998). Já foram obtidos resultados promissores com algodão (PERLAK *et al.*, 1991), arroz (FUJIMOTO *et al.*, 1993), batata (CHENG *et al.*, 1992), milho (KOZIEL *et al.*, 1992), tomate (FISCHHOFF *et al.*, 1987, JANSEN *et al.*, 1992).

A possibilidade de se explorar mais a diversidade encontrada nesta bactéria e espécies correlatas foi aventada por CHILCOTT & WIGLEY (1994), que alertam para o fato de que vêm sendo encontradas linhagens ativas contra outros

insetos que não os usualmente suscetíveis. Também processos efetivos de seleção de isolados na natureza precisam ser desenvolvidos

De qualquer modo, essas tecnologias estão contribuindo para obtenção de produtos de controle microbiano que poderão reduzir o uso de agroquímicos.

De modo geral pode-se dizer que destes estudos, alguns resultados interessantes vêm sendo obtidos com a descoberta de que, se certos genes de produção de toxinas são colocados na mesma bactéria, ocorrem sinergismos surgindo propriedades novas nas toxinas (TABASCHNIK, 1992).

Atualmente são utilizadas várias técnicas da engenharia genética para seleção de organismos, tais como marcadores isoenzimáticos, marcadores moleculares (PCR, RFLP, RAPD), entre outras. Todas essas técnicas, além de caracterizar bem os isolados e linhagens ou mesmo variedades dentro de espécies, são importantes auxiliares do melhoramento genético, pois permitem que em cruzamentos, linhagens mais ou menos variáveis sejam empregadas, conforme o que se quer obter. Também como as linhagens possuem padrões bem definidos identificados por essas técnicas, elas podem ser aplicadas em campo e recuperadas de insetos atacados, sendo assim possível distinguir linhagens aplicadas deliberadamente em uma área, de outras já naturalmente existentes ali (AZEVEDO, 1998a).

A necessidade da busca de novas cepas de *Bacillus thuringiensis* que apresentem um potencial inseticida mais abrangente e eficiente se faz mais evidente a cada dia que passa, visto os transtornos ao homem e a natureza, causados pelos produtos químicos. A região do Triângulo Mineiro é grande produtora de milho, sendo alvo do ataque de *Spodoptera frugiperda* (Lepidóptera: Noctuídae), uma das principais pragas desta cultura, que pode causar até 34% de queda na produtividade (VALICENTE & CRUZ, 1991).

Este trabalho tem por objetivo fazer o mapeamento da ocorrência de cepas de *Bacillus thuringiensis* na região do Triângulo Mineiro e sua caracterização molecular, utilizando-se das técnicas PCR e RAPD-PCR com *primers* específicos e aleatórios respectivamente e concomitantemente efetuar testes de patogenicidade em *Spodoptera frugiperda* (Lepidóptera: Noctuídae), com as bactérias selecionadas.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O crescente interesse na utilização de bactérias entomopatogênicas para o controle de populações de insetos prejudiciais levou o homem a pesquisar mais profundamente as bactérias que formam os esporos, pois é uma característica de persistência e simplesmente um pré-requisito para que um agente possa ser produzido em escala comercial. Embora sejam conhecidas centenas de espécies de bactérias associadas com insetos, são poucas aquelas que possuem características que permitem o seu uso no controle de insetos prejudiciais. As espécies de maior importância concentram-se nas famílias Enterobacteriaceae e Bacillaceae, além de alguns gêneros da ordem Pseudomonadales (HABIB & ANDRADE, 1998).

A família Bacillaceae, amplamente estudada, envolve dois gêneros de alta importância, *Bacillus* e *Clostridium*. (HABIB & ANDRADE, 1986)

Dentre as bactérias com potencial de uso no controle microbiano de insetos, destacam-se as do gênero *Bacillus* (GILL *et al.*, 1992).

2.1. PATÓGENOS DO GÊNERO *Bacillus*

As espécies do gênero *Bacillus* são representadas por células em forma de bastonete, às vezes em cadeia, com a maioria capaz de produzir endósporos que representam sua forma de resistência quando o meio se encontra desfavorável para seu desenvolvimento. As espécies desse gênero, em geral, aeróbicas ou facultativamente anaeróbicas, podem atacar substratos variáveis, devido ao complexo enzimático produzido pelas células. Apesar da grande variação entre as diferentes espécies desse gênero, várias características como a formação de esporos, toxinas e enzimas, levaram os patógenos pertencentes a esse gênero a um lugar privilegiado entre os agentes altamente promissores no controle dos insetos prejudiciais (HABIB & ANDRADE, 1986).

2.2. *Bacillus thuringiensis* BERLINER

Bacillus thuringiensis foi isolado de larvas mortas de *Bombyx mori* (bicho-da-seda) e descrita pela primeira vez, no início do século, pelo bacteriologista japonês Ishiwata em 1901. Sua denominação atual data de seu reisolamento a partir de larvas mortas de *Anagatha kuniella*, no distrito de Thuringe, Alemanha em 1911, por Berliner (VALADARES *et al.*, 1998).

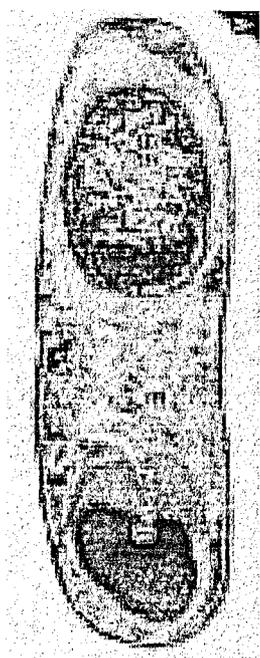


FIGURA 1: *Bacillus thuringiensis* apresentando na parte de cima, o esporo e em baixo, o cristal protéico

A célula bacteriana (Figura 1) é um bastonete de 1,0 a 1,2 por 3,0 a 5,0 μm , geralmente com motilidade. É aeróbica podendo facultativamente crescer em anaerobiose, dentro da faixa de 10 a 45°C. É gram positiva, apresentando como característica típica a presença de um cristal protéico intracelular (HABIB & ANDRADE, 1986).

As colônias de *Bacillus* apresentam morfologia típica com colônias de tamanho médio (aproximadamente 0,5 cm) esbranquiçadas, opacas, com bordas irregulares (SOSA-GÓMEZ, 1998)

HANNAY (1953) foi o primeiro a detectar a presença de cristais de "diamante" em culturas esporuladas de *Bacillus thuringiensis*, relacionando-os com a patogenicidade desta bactéria.

HABIB & ANDRADE, (1986) citam que as descobertas de diferentes variedades desta bactéria cristalífera, com seus variáveis níveis de patogenicidade, indicam possível ocorrência de evolução e adaptação desses patógenos dentro de uma razoável gama de hospedeiros naturais. VANKOVA (1964) avaliou 12 linhagens de *Bacillus thuringiensis* var *thuringiensis*, quanto à sua patogenicidade em oito espécies de lepidópteros e encontrou evidências de patogenicidade seletiva. Junto com estes, vários outros trabalhos realizados confirmam a hipótese de haver coevolução e adaptação entre essas linhagens e seus hospedeiros (KRIEG & FRANZ, 1959; GRIGOROVA, 1964; SHAIKH & MORRISON, 1966).

2.2.1. Principais toxinas produzidas por *Bacillus thuringiensis*

A atividade entomopatogênica desse microrganismo deve-se à presença de uma inclusão cristalina produzida durante a esporulação. O cristal, composto por proteínas denominadas δ -endotoxinas ou proteínas cristal (Cry), apresenta ação extremamente tóxica e altamente específica para larvas de insetos de três ordens: Lepidóptera, Díptera e Coleóptera. As toxinas contidas no cristal são inócuas para o homem, os vegetais, os animais e outros invertebrados (VALADARES *et al.*, 1998).

O *Bacillus thuringiensis* produz diversas toxinas sendo que as conhecidas e mais estudadas são a δ -endotoxina, β -exotoxina, endósporo, α -exotoxina e toxina dos piolhos.

2.2.1.1. δ -endotoxina

O cristal protéico (corpo paraesporal), descoberto por HANNAY (1953), é um agregado de moléculas, geralmente em forma bipiramidal, e com peso molecular de aproximadamente 230.000 daltons. Este cristal representa o componente principal dos produtos comerciais à base de *Bacillus thuringiensis*.

Após o crescimento vegetativo em meio artificial, *Bacillus thuringiensis* transforma-se num esporo resistente às condições ambientais adversas. O cristal é formado durante esse processo de esporulação.

Atualmente sabe-se que o cristal protéico de *Bacillus thuringiensis*, em si, não tem ação tóxica, sendo considerado como protoxina. A sua dissolução em meio alcalino (acima de pH 8) resulta em moléculas de tamanhos variáveis, das quais algumas são tóxicas para insetos.

Ação da δ -endotoxina sobre insetos

A maioria dos estudos sobre o modo de ação das proteínas Cry foi realizada em Lepidóptera. Essas toxinas, sintetizadas como protoxinas, provocam lesões no epitélio intestinal dos insetos sensíveis, em seu estágio larval. Após a ingestão, os cristais são solubilizados dentro do tubo digestivo do inseto-alvo, graças a um pH alcalino (10, em média). Após a solubilização, são ativados por proteases contidas no fluido intestinal, liberando a porção N-terminal tóxica. Uma vez ativada, a toxina se liga de maneira irreversível a receptores específicos, presentes na superfície da membrana das células epiteliais, culminando na formação de poros (SACCHI *et al.*, 1986, HENDRICKX *et al.*, 1990), seguida por desequilíbrio osmótico entre o meio intra e extracelular. A alteração da permeabilidade da membrana faz com que ocorra lise celular (CHARLES & DE BARJAC, 1983) e, finalmente, a morte da larva.

2.2.1.2. β -exotoxina

De peso molecular pequeno, análoga ao ATP e composta de adenina, ribose e fósforo (1:1:1), essa substância impede a biossíntese de RNA nas células afetadas (DE BARJAC & DEDONDER, 1965).

2.2.1.3. Endósporo

Foi revelada e confirmada a presença de uma proteína na parede do endósporo, química e sorologicamente semelhante a proteína do cristal. Embora em quantidade menor, a proteína do esporo também tem efeito tóxico para lagartas (BURGES *et al.*, 1976 *apud* HABIB & ANDRADE, 1998).

2.2.1.4. α -exotoxina

TOUMANOFF (1953) denominou e caracterizou esta toxina como Lecitinase-C; solúvel em água, termolábil e tóxica para insetos. Essa toxina também produzida por *Bacillus cereus*, exige um intervalo de pH entre 6,6 e 7,4 para melhor atuação.

2.2.1.5. Toxina dos piolhos

GINGRICH *et al.* (1974) detectaram alta susceptibilidade de quatro espécies de piolhos de mamíferos (*Bovicola bovis*, *Bovicola crassipes*, *Bovicola limbata* e *Bovicola ovis*) a uma linhagem de *Bacillus thuringiensis* não produtora de β -exotoxina, substância tóxica inclusive para estes insetos. Como a δ -endotoxina (do cristal protéico) não tem efeito patogênico nos piolhos, pois o pH intestinal não permite a dissolução do cristal, a morte desses piolhos foi atribuída então a uma nova substância.

2.2.2. Identificação da atividade inseticida de *Bacillus thuringiensis*

Em 1962, De Barjac e Bonnefoi propuseram uma classificação de sorotipos baseada em propriedades bioquímicas e na aglutinação de antígenos flagelares (antígeno H). Atualmente, existem catalogados 45 sorotipos, porém essa classificação não está relacionada com a atividade inseticida, que é definida pela composição das δ -endotoxinas.

Em 1989, quando 14 tipos diferentes de δ -endotoxinas haviam sido caracterizadas, Höfte e Whiteley propuseram uma nomenclatura baseada nas sequências de aminoácidos deduzidas e no espectro de atividade. Foram descritas cinco classes principais: CryI (ativa para Lepidóptera), CryII (Lepidóptera e Díptera), CryIII (Coleóptera), Cry IV (Díptera) e Cyt (citolisina, associada a Cry IV), 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 Coleóptera e Lepidóptera foi designada CryV (TAILOR *et al.*, 1992).

Baseado nas sequências nucleotídicas conhecidas, sondas específicas de DNA e anticorpos monoclonais são utilizadas para determinar a composição de δ -endotoxinas de uma cepa determinada e, conseqüentemente, sua possível atividade inseticida (LERECLUS *et al.*, 1993). Atualmente, *primers* específicos para cada classe são ferramentas potentes e amplamente utilizadas para a predição da atividade via PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (BEM-DOV *et al.*, 1997, CERON *et al.*, 1995, SHIN *et al.*, 1995, CERON *et al.*, 1994, KALMAN *et al.*, 1993, CAROZZI *et al.*, 1991). Essa estratégia permite direcionar os bioensaios, que irão confirmar a predição com grande economia de tempo e material.

2.3. MARCADORES MOLECULARES

Os primeiros marcadores utilizados na genética eram controlados por genes associados a caracteres morfológicos, em geral fenótipos de fácil identificação visual. Isto se tratando de plantas ou até mesmo animais, sendo mais restrito quando se tratavam de observação em microrganismos.

Este quadro mudou com o desenvolvimento de marcadores isoenzimáticos que ampliaram em pelo menos uma ordem de magnitude (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). Em seqüência, a utilização de enzimas de restrição permitiu a análise de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição de DNA (*Restriction Fragment Length Polymorphism* - RFLP) (GRODZICKER *et al.*, 1974).

Mais recentemente, o desenvolvimento do processo de amplificação em cadeia utilizando uma DNA polimerase (PCR) (MULLIS & FALLONA, 1987; SAIKI *et al.*, 1988) levou a descrição de outras classes de marcadores moleculares.

A tecnologia do PCR causou uma verdadeira revolução na biologia tanto na pesquisa visando o entendimento de processos biológicos fundamentais como nas áreas aplicadas envolvendo diagnósticos e melhoramento genético de organismos em geral. O impacto da PCR e dos métodos dela derivados levaram Kary Mullis a ganhar o prêmio Nobel de medicina no início da década de 90 (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

As técnicas de análise direta do DNA de microrganismos entomopatogênicos são de utilidade na identificação, caracterização, mapeamento genético e estimativa da biodiversidade existente dentro de espécies de interesse no controle microbiano (AZEVEDO, 1998).

2.3.1. PCR

PCR é uma técnica de síntese enzimática *in vitro* de uma sequência definida de DNA. A reação usa dois *primers* que hibridizam às fitas opostas que flanqueiam a sequência de DNA alvo a ser amplificada. A extensão dos *primers* é catalizada pela Taq DNA polimerase, uma polimerase de DNA termo-estável, que é isolada de uma eubactéria termofílica *Thermus aquaticus*. Uma série repetitiva de ciclos envolvendo desnaturação do DNA molde, anelamento de *primers* e a extensão deles pela Taq DNA polimerase, resulta em um acúmulo exponencial de um fragmento específico de DNA. As extremidades dos fragmentos são definidas pelo término 5' dos *primers*. Como o produto da extensão dos *primers* acumula a cada ciclo e pode servir como um molde para o próximo, o número de cópias alvo dobra aproximadamente a ocorrência de cada um deles (BOEHRINGER MANNHEIM BIOCHEMICA, 1995)

SAIKI *et al.* (1988) mostraram que 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 tem 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. A temperatura de anelamento também afeta a especificidade da Taq DNA polimerase, onde o aumento da temperatura diminuiu o aparecimento de produtos inespecíficos.

A otimização da PCR envolve testes de diferentes variáveis, tais como temperatura de anelamento, estrutura dos *primers* (LOWE *et al.*, 1990, WANG *et al.*, 1994 e ROUX, 1995), tempo dos ciclos de amplificação conforme discutido por WITTWER *et al.*, (1990) que concluiu que o passo limitante é o tempo de extensão, que depende do tamanho do fragmento e atividade da DNA polimerase,

enquanto que o anelamento e desnaturação ocorrem muito rapidamente, desde que a amostra atinja a temperatura ideal.

Outros fatores que podem interferir na produtividade da reação de amplificação é a presença de agentes inibidores e a concentração de $MgCl_2$. ROUX (1995) descreve alguns agentes inibidores, incluindo detergentes iônicos (SDS e Sarkosyl, usados na extração de DNA), fenol, heparina, xylene cyanol e bromophenol blue. Proteinase K pode digerir a Taq DNA polimerase, mas é prontamente inativada à $95^\circ C$ por 5 minutos. O mesmo autor sugere manipular a concentração de $MgCl_2$ desde 0,5 mM até 5 mM com incrementos de 0,5 mM.

Com o desenvolvimento da tecnologia da reação em cadeia de polimerase, inúmeras outras técnicas (AFLP, RNA display, VNTR e outras) foram desenvolvidas para a detecção de polimorfismos de DNAs. Uma destas técnicas, que tem sido muito usada em estudos de populações, foi desenvolvida independentemente por WILLIAMS *et al.* e WELSH & MACCLELLAND (1990). A técnica foi denominada de DNA polimórfico amplificado ao acaso (RAPD - Random Amplified Polymorphic DNA) e AP - PCR (Arbitrary Primed-Polymerase Chain Reaction), respectivamente.

O PCR é um método altamente sensível para rapidamente detectar e identificar sequências de DNA, requerendo quantidades diminutas de DNA e permitindo rápida seleção simultânea de várias amostras de *Bacillus thuringiensis*, predizendo sua atividade inseticida (CAROZZI, *et al.*, 1991, CERON *et al.* 1994, CERON, *et al.* 1995)

PCR tem sido explorado para prever atividades inseticidas, para identificar genes tipo *cry* e determinar sua distribuição e para detectar novos genes. Para otimizar a identificação de todos genes *cry* reportados, esta metodologia necessita um completo grupo *primers* (CERON *et al.*, 1994, CERON *et al.*, 1995).

2.3.2. RAPD

RAPD veio sanar um grande problema que restringia o uso da PCR que dependia do conhecimento prévio da sequência a ser amplificada. Ela surgiu em 1990 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. Os *primers* (com cerca de 10 pares de bases) utilizados, são colocados em condições de baixa estringência tendo assim maiores chances de se ligar a várias sequências de DNA complementares. Para que estas sequências sejam amplificadas elas devem estar posicionadas numa distância máxima de 4000 pares de bases e em orientação oposta, permitindo assim uma amplificação exponencial de um segmento de DNA pela DNA polimerase. A banda amplificada é então visualizada 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 (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998) ou em sistema de documentação.

A técnica de RAPD tem sido aplicada na construção de mapas genéticos (REITER *et al.*, 1992) e em estratégias, como a análise de segregantes em *bulk*, para detectar marcadores ligados à genes de resistência à doenças de plantas (MILCHELMORE *et al.*, 1991), bem como em estudos taxonômicos e verificação de diversidade entre isolados de uma mesma espécie (AZEVEDO, 1998)

Os marcadores por RAPD são usualmente dominantes porque os polimorfismos são detectados como presença ou ausência de bandas. A deleção ou inserção leva à perda do sítio de homologia para um dos *primers*, resultando então na ausência daquela banda no gel de agarose. Assim, a técnica de RAPD detecta apenas um alelo em cada *locus*, não sendo possível distinguir se aquele segmento se originou a partir de uma ou de duas cópias da sequência amplificada. Esses marcadores possibilitam um método rápido para o fornecimento e análise de populações (HU & QUIROS, 1991), cuja frequência de polimorfismo dificilmente é encontrada em outros métodos tal como eletroforese de proteínas entre outros.

A técnica de RAPD apresenta dois atributos que resumem toda uma série de vantagens práticas: simplicidade e rapidez. Por exemplo, marcadores RAPD foram 4 a 6 vezes mais eficientes do que RFLP no mapeamento de polimorfismos ligados a locos de resistência a doenças, e 10 vezes mais eficientes em tempo e mão-de-obra (PARAN *et al.*, 1991). Isso se deve à possibilidade de se detectar polimorfismo pela visualização direta das banda no gel, eliminando todas as etapas de transferência de DNA para membranas (*Southern blot*), hibridação com

sondas e autoradiografia. Não requerer desenvolvimento prévio de uma biblioteca de sondas específicas, a não utilização de isótopos radioativos ou marcação não-radioativa, a quantidade mínima de DNA utilizada, o custo baixo, são vantagens que a técnica RAPD oferece nos estudos de polimorfismos em qualquer organismo. RAPD reúne, portanto, a simplicidade da técnica da visualização direta dos marcadores isoenzimáticos, com o poder de resolução dos marcadores de DNA. É uma tecnologia bastante acessível, que pode ser transferida diretamente para estações experimentais de melhoramento, para laboratórios avançados de pesquisa e ser utilizada cotidianamente pelo geneticista (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998)

A principal limitação dos marcadores RAPD é o baixo conteúdo de informação genética por loco. Apenas um alelo é detectado, o segmento que é amplificado, enquanto que as demais variações alélicas são classificadas conjuntamente como um alelo nulo. A falta de reprodutibilidade entre as reações tem levado pesquisadores de diversos laboratórios a estabelecerem suas condições ótimas de trabalho. SCHIERWATER & ENDER (1993) comparou o padrão de amplificação de 13 DNA polimerases comerciais. Eles observaram que todas as polimerases derivadas de *Thermus aquaticus* produzem amplificações similares, enquanto que todas as polimerases de outras fontes (exceto *Thermus flavus*) amplificaram muito pouco ou nenhum produto.

Variações nos padrões RAPD são observados ente termocicladores e entre polimerases diferentes. MEUNIER & GRIMONT (1993) testaram dois termocicladores e 2 marcas diferentes de Taq DNA polimerase com diferentes amostras de DNA, por 6 vezes. Eles observaram que a reprodutibilidade foi excelente quando usados o mesmo termociclador e Taq polimerase. O mesmo não aconteceu, quando o aparelho e a Taq eram diferentes. Um outro fato crítico nas reações, usando-se termocicladores diferentes (ciclo rápido e tradicional com aquecimento de placa), é o aparecimento de fragmentos múltiplos (WITTWER & GARLING, 1991), que surgem em maior frequência, devido ao aumento no tempo de salto (tempo gasto para se atingir a temperatura de anelamento a partir da temperatura de desnaturação).

Outro aspecto que pode ser uma limitação em alguns casos é o desconhecimento prévio da base genética das bandas RAPD. Estritamente

falando, uma banda RAPD observada no gel só pode ser considerada um marcador de comportamento Mendeliano depois de verificada sua segregação de parentais para descendentes. É importante ressaltar, no entanto, que este pré-requisito é necessário, em princípio, para todo e qualquer tipo de marcador molecular, isoenzimas, RFLP ou outros (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Estas técnicas descritas acima não identificam isolados de *Bacillus thuringiensis* portadores de novos genes. Os novos genes responsáveis por toxinas *cry* desconhecidas são caracterizados por clonagem e sequenciamento direto do seu DNA (SEKAR *et al.*, 1987), depois que a análise do gel de proteína e o bioensaio indicarem tratar-se de uma toxina desconhecida (SANCHIS *et al.*, 1989)

HANSEN, 1998 cita que na classificação de determinadas cepas de *Bacillus thuringiensis*, utilizou-se de serotipos conhecidos e hibridização de colônia para classificar cepas confirmando com análise de PCR em muitos dos casos. Os casos não confirmados por PCR foram devido a variação na sequência do DNA na região de ligação de um dos *primers*. A análise de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA mostrou que isolados não separados puderam ser distintos por este método. A análise por RAPD revelou que um serovar *israelensis* sem nenhum gene codificando atividade para dípteros sofreu um desvio de um outro isolado padrão utilizado em produtos comerciais.

Isto mostra que o RAPD pode ser utilizado como ferramenta auxiliar à outras técnicas, na busca de novas cepas com níveis de patogenicidade apreciáveis ou até mesmo com abrangência de mais que uma ordem de insetos.

Atualmente, com mais de 50 tipos de genes de proteínas Cry, clonados e sequenciados, a nomenclatura se tornou inadequada, já que genes com sequências similares apresentam atividades inseticida distinta. Diante desse quadro, foi criado um comitê internacional, que está propondo uma nova nomenclatura baseada apenas nas sequências de aminoácidos (VALADARES *et al.*, 1998)

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos nos Laboratórios de Genética Molecular – Departamento de Genética e Bioquímica (DEGEB) e Controle Biológico de Insetos – Departamento de Agronomia (DEAGO) da Universidade Federal de Uberlândia, Laboratório de Controle Biológico e Laboratório de Criação de Insetos (LACRI) do Centro Nacional de Milho e Sorgo (CNPMS) – Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária (EMBRAPA).

3.1. MATERIAL BIOLÓGICO

3.1.1. *Bacillus thuringiensis*

3.1.1.1. Preparo do meio LB (Luria-Bertani)

O meio de cultura para *Bacillus thuringiensis* foi preparado segundo SAMBROOK *et al.*, (1989) com algumas alterações. Para cada litro de meio, utilizou-se 1000 ml de água deionizada, 10 g de tripton, 5 g de extrato de levedura e 10 g de NaCl. Colocou-se os compostos em erlemeyer, adicionando 950 ml de água deionizada, dissolvendo bem, completando então com 50 ml de água deionizada. Lacrou-se o erlemeyer e levou-o ao autoclave por 15 minutos. Em seguida, levou-se o erlemeyer a câmara de fluxo deixando a temperatura baixar a aproximadamente 50°C, adicionando-se então Penicilina G (7,5 mg/250ml). Para meio sólido utilizou-se bactoágar (12 g/l), sendo adicionado antes de se levar o erlemeyer ao autoclave.

3.1.1.2. Extração, seleção e identificação de *Bacillus thuringiensis* do solo

As amostras de solo foram fornecidas pelo Laboratório de Análises de Solo (LABAS) da Universidade Federal de Uberlândia.

Para extração de *Bacillus thuringiensis* pesou-se 1 g da amostra de solo e adicionou-se 5 ml de solução salina (0.8g NaCl/l), deixando agitar por toda noite. Homogeinizou-se em vórtex por 1 minuto deixando decantar. Transferiu-se então 1 ml da suspensão para ependorfs incubando em banho-maria a 65°C por 30 minutos. Deu-se um choque térmico em em seguida plaqueou-se 200 µl em meio LB. Incubou-se a 30°C por 36 horas. Analisou-se as colônias que cresceram, separando as que apresentaram diferença visual na mesma placa para outras placas de *petri*. Deixou-se em crescimento por mais 36 horas fazendo em seguida lâminas para serem usadas em microscópio de contraste de fase. Utilizou-se uma lente de 100 vezes de aumento de contraste de fase para se visualizar o cristal, característico do *Bacillus thuringiensis*, nas colônias selecionadas

Das cepas crescidas e selecionadas em meio LB com penicilina e identificadas como *Bacillus thuringiensis*, escolheu se 25 amostras das localidades indicadas na Figura 2.

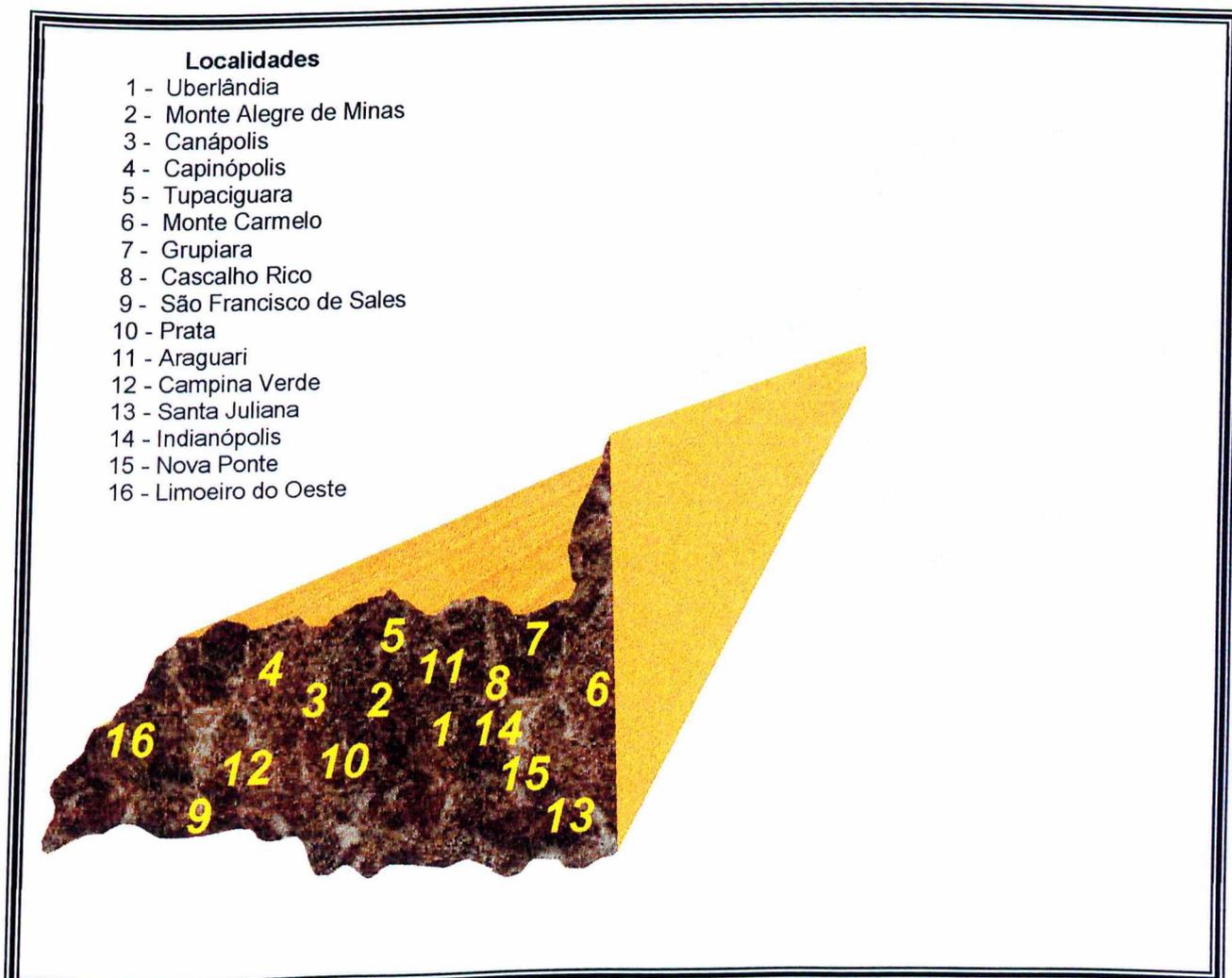


FIGURA 2. Mapa da localização na região do Triângulo Mineiro das cepas de *Bacillus thuringiensis* selecionadas.

TABELA 1: Origem das 25 amostras avaliadas neste estudo e número de referência utilizado nas reações de PCR e RAPD.

N.	Origem	N.	Origem
3.	Campina Verde	16.	Uberlândia
4.	Cascalho Rico	17.	Araguari
5.	Monte Alegre	18.	Uberlândia
6.	Capinópolis	19.	Indianópolis
7.	Limoeiro do Oeste	20.	Santa Juliana
8.	Grupiara	21.	Nova Ponte
9.	Indianópolis	22.	Monte Carmelo
10.	Prata	23.	Monte Alegre
11.	Araguari	24.	Tupaciguara
12.	Capinópolis	25.	Capinópolis
13.	Monte Alegre	26.	Monte Carmelo
14.	Canápolis	27.	Santa Juliana
15.	São Francisco de Sales		

Foram utilizadas 3 cepas de *Bacillus thuringiensis* como padrão, provenientes de diferentes locais, para confirmação e comparação dos *primers* universais (Tabela 3).

TABELA 2: Origem, gene e especificidade das 3 cepas utilizadas como padrão para análise de PCR

Cepa	Origem	Gene	Especificidade
HD27	CNPMA-EMBRAPA	cry1	Lepidópteros
Purdue	Purdue University	cry3	Coleópteros
Fio 584	Instituto Oswaldo Cruz	cry4	Dípteros

3.1.1.3. Extração de DNA

Obteve-se DNA de *Bacillus thuringiensis*, centrifugando-se 3 ml de cultura de meio líquido LB a 8.000 rpm por 10 min. Adicionou-se 500 µl da Solução I (SDS 1 g/100ml EDTA 0.0005M, TrisCl 0.1M pH 8.0, NaCl 0.2M) previamente colocada em banho-maria a 50°C por 10 minutos e 20 µl de proteinase K (10mg/ml) incubando a 50°C por toda a noite. Adicionou-se 300 µl de fenol e 200 µl de clorofórmio, agitando em suaves inversões por 10 minutos. Centrifugou-se a 8000 rpm por 10 minutos, transferindo o sobrenadante para outro microtubo. Adicionou-se 15 µl de RNase (10mg/ml) deixando incubar por 1 hora a 37°C. Em

seguida adicionou-se igual volume de clorofórmio, agitando suavemente. Centrifugou-se a 8000 rpm por 10 minutos. Repetiu-se esta lavagem com clorofórmio mais duas vezes. Precipitou-se os ácidos nucleicos pela adição de isopropanol gelado (2 volumes). Misturou-se então por inversões até os ácidos nucleicos se tornarem visíveis, deixando a 4°C por toda a noite. Após este período, centrifugou-se a 13000 rpm por 15 minutos, descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 500 µl de etanol 70%. Agitou-se suavemente e descartou-se o sobrenadante, deixando o *pellet* secar a 40 graus por 10 minutos. Ressuspendeu-se o *pellet* em 100 µl de água deionizada e quantificou-se o DNA em espectrofotômetro. Avaliou-se também a qualidade do DNA em gel de agarose (Figura 3). Depois de quantificado, o DNA foi diluído em água a 10 ng/ml para ser utilizado na determinação da especificidade por PCR e também nas análises por RAPD.

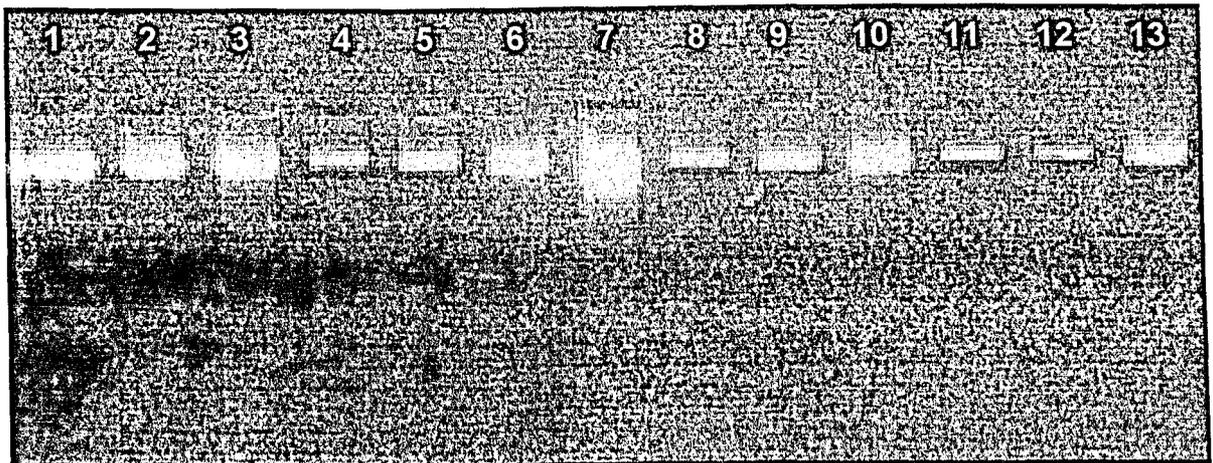


FIGURA 3: Avaliação de DNA em gel de agarose 1,2%. 1 – *Bacillus thuringiensis* var *thuringiensis*. 2 à 13 – Amostras coletadas no Triângulo Mineiro.

3.1.2. *Spodoptera frugiperda* (Lepidóptera: Noctuídae)

A lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*, Smith, 1797 – Lepidóptera – Noctuídae) é uma das espécies mais frequentes em campos cultivados da Região Neotrópica. Embora seja polífaga, manifesta nítida preferência por gramíneas, principalmente milho (GARCIA, 1979), e é considerada uma das principais pragas do milho. Pode ocorrer durante todos os estádios de crescimento da cultura,

assumindo grande importância no México, América Central e América do Sul, causando perdas de até 34% (VALICENTE & CRUZ, 1991).

As larvas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidóptera: Noctuídae) utilizadas nos testes de patogenicidade foram fornecidas pelo Centro Nacional de Milho e Sorgo (CNPMS) – EMBRAPA. Utilizou-se larvas de 1º e 2º instar alimentadas com dieta artificial.

3.1.2.1. Preparo da Dieta Artificial

A dieta utilizada teve como base o feijão e vem sendo usada no Departamento de Entomologia da ESALQ há alguns anos (KASTEN *et al.*, 1978) com sucesso, e cuja composição esta descrita na Tabela 1. Esta quantidade é suficiente para 80 recipientes de criação (copinhos plásticos de 50 ml).

TABELA 3: Nutrientes utilizados em dieta artificial de *Spodoptera frugiperda* (Lepidóptera: Noctuídae).

Componentes	Quantidade
Feijão	100,0 g
Levedura de cerveja	15,0 g
Ácido ascórbico	1,5 g
Metilparaidroxibenzoato (nipagin)	1,0 g
Ácido sórbico	0,5 g
Formaldeído (38%)	1,0 ml
Ágar (+ 250 ml de água)	12,0 g
Água	375,0 ml

O feijão é cozido, sendo que a variedade Carioca é a que proporciona o melhor desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* (Lepidóptera: Noctuídae) (PARRA & CARVALHO, 1984)

O preparo da dieta é feito misturando-se os ingredientes, exceto o ágar, em água e batendo-se em liquidificador. O ágar é dissolvido separadamente em água em ebulição. A seguir, os dois conteúdos são misturados e homogeneizados através de um agitador elétrico, sendo a dieta transferida, ainda quente, para bandejas que ficarão armazenadas em geladeira.

3.1.2.2. Testes de Patogenicidade

Para os testes de patogenicidade seguiu-se a metodologia utilizada na EMBRAPA-CNPMS, que consiste em ministrar à larvas neonatas, tabletes (1x1 cm) de dieta artificial sem antibióticos, banhadas em suspensão da bactéria. Para cada cepa utilizou-se 24 larvas.

As larvas foram individualizadas em recipientes de 25 ml, vedados com tampas de acrílico e colocadas a temperatura de 29° C. Diariamente observou-se a mortalidade larvária correspondente, anotando os resultados. Para cada cepa observou-se a mortalidade durante um período de seis dias.

3.2. Determinação da especificidade inseticida de *Bacillus thuringiensis* por PCR

Para a análise de PCR foram utilizados *primers* denominados universais, correspondentes a regiões altamente conservadas nos genes *cry1* (20), *cry2* (3), *cry3* (4), *cry4* (2), *cry7* (2) e *cry8* (3) (extraído do GenBank) (BEM-DOV *et al.*, 1997). Utilizou-se três pares de *primers*:

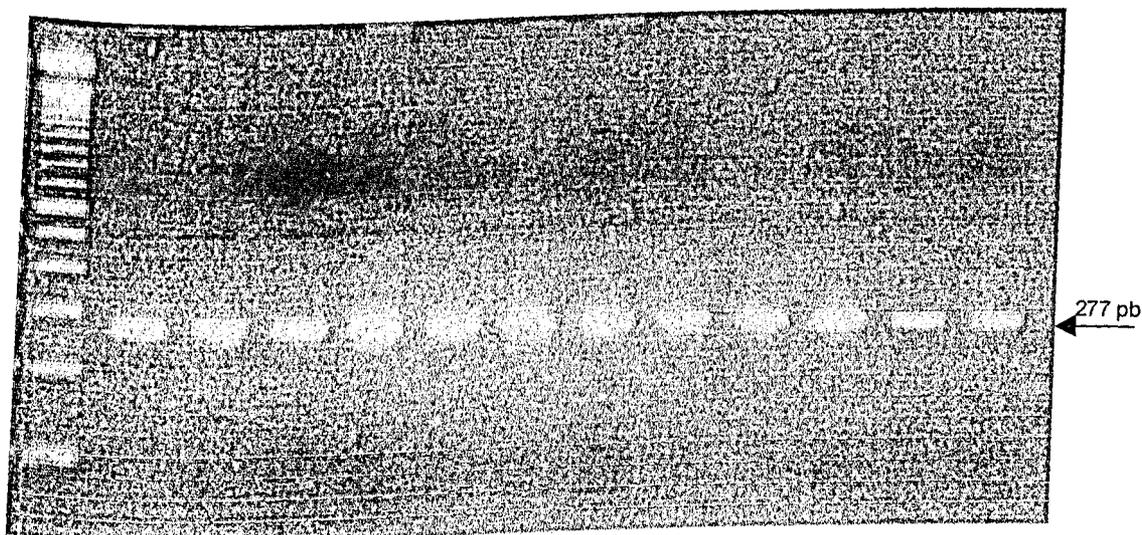


FIGURA 4: Otimização do primer Universal 1 específico para Lepidópteros. Condições: **Primer** (10pmol/ μ l) – 0,5 μ l: canaletas 1; 3, 5, 7, 9, 11. 1,0 μ l canaletas 2, 4, 6, 8, 10, 12. **MgCl₂ (25mM)** – 0,0 μ l: canaletas 1, 2, 7, 8. 1,0 μ l: canaletas 3, 4, 9, 10. 2,0 μ l: canaletas 5, 6, 11, 12. **Taq DNA polimerase (5U/ μ l)** – 0,1 μ l: canaletas 1 à 6. 0,2 μ l: canaletas 7 à 12. **dNTPs (60Mm)** – 0,25 μ l. **Tampão (10x)** – 2,5 μ l. **DNA (150,25 ng// μ l)** – 1,0 μ l.

02600/99

TABELA 4: Primers Universais utilizados na determinação da especificidade das amostras de *Bacillus thuringiensis*

PRIMER	SEQUÊNCIA (5' → 3')
Un1(d)	CAT GAT TCA TGC GGC AGA TAA AC
Un1(r)	TTG TGA CAC TTC TGC TTC CCA TT
Un3(d)	CGT TAT CGC AGA GAG ATG ACA TTA AC
Un3(r)	CAT CTG TTG TTT CTG GAG GCA AT
Un4(d)	GCA TAT GAT GTA GCG AAA CAA GCC
Un4(r)	GCG TGA CAT ACC CAT TTC CAG GTC C

As condições ótimas para os componentes foi determinada por meio de vários testes, variando suas concentrações, bem como o programa de amplificação, que foi executado em um Termociclador modelo PTC-100™, da M. J. Research, Inc.

As reações de amplificação consistiram uma etapa inicial de 95° C por 5 minutos seguida de 30 ciclos. Cada um com uma etapa de desnaturação (94° C por 1 minuto), uma etapa de anelamento (60°C por 45 segundos) e uma etapa de extensão (72°C por 5 minutos).

O volume total de cada reação foi de 25µl contendo: 2,5µl de Tampão da Taq DNA polimerase (Tris-HCl 10 mM(pH 8,0), KCl 50 mM. MgCl₂ 15mM), 15 µl de DNA (10 ng/µl), 0,1 µl de Taq DNA polimerase (5U/µl), 1 µl *primer* (5 pmol/µl), 0,5 µl de desoxiribonucleotídeo trifosfato (10 mM de cada - dATP, dTTP, dCTP e dGTP), completando-se o resto com água ultrapura. Na reação de amplificação utilizou-se um controle contendo todos os componentes, exceto o DNA, verificando-se assim possíveis contaminações.

Ao término das reações, os fragmentos de DNA amplificados foram separados por eletroforese em géis de agarose a 2%, preparados de acordo com SAMBROOK *et al.*, (1989) e corridos a 120 volts por aproximadamente 1 hora em tampão TBE 0,5 X (Tris-Borato 0,045M e EDTA 0,001 M). Utilizou-se como padrão de peso molecular o 100 pb e 1 Kb DNA ladder. Para avaliação, os géis de agarose foram corados com EtBr (0,5µg/ml), observados em transluminador UV e fotografado em Video Documentation System da Pharmacia Biotech.

3.3. DETERMINAÇÃO DE POLIMORFISMOS ENTRE AMOSTRAS DE *Bacillus thuringiensis* UTILIZANDO RAPD-PCR

Utilizou-se apenas uma amostra em algumas localidades em conformidade com AYALA (1983) que observou que os métodos de análise de variabilidade devem considerar que as amostras individuais não são mais ou menos, mas sim, representantes genéticos da população em questão.

Considerou-se somente 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).

Testou-se 25 *primers*, sendo que 13 apresentaram bandas passíveis de serem analisadas. Os *primers* utilizados continham 10-mer com sequências arbitrárias, obtidos de kits da OPERON Technologies Inc (Tabela 5).

TABELA 5: *Primers* utilizados e suas respectivas sequências de nucleotídeos

PRIMER	SEQUÊNCIA (5' → 3')
OPC09	CTC ACC GTC C
OPC11	AAA GCT GCG G
OPG15	ACT GGG ACT C
OPI05	TGT TCC ACG G
OPM05	GGG AAC GTG T
OPM07	CCG TGA CTC A
OPM12	GGG ACG TTG G
OPM14	AGG GTC GTT C
OPM18	CAC CAT CCG T
OPM19	CCT TCA GGC A
OPT06	CAA GGG CAG A
OPT13	AGG ACT GCC A
OPX04	CCG CTA CCG A

Como no PCR as condições ótimas para os componentes foi determinada por meio de vários testes, variando suas concentrações utilizando um programa de amplificação, feito em um Termociclador modelo PTC-100™, da M. J. Research, Inc.

Os *primers* foram escolhidos fazendo-se um teste preliminar com duas amostras de *Bacillus thuringiensis* e vários *primers* (Figura 5).

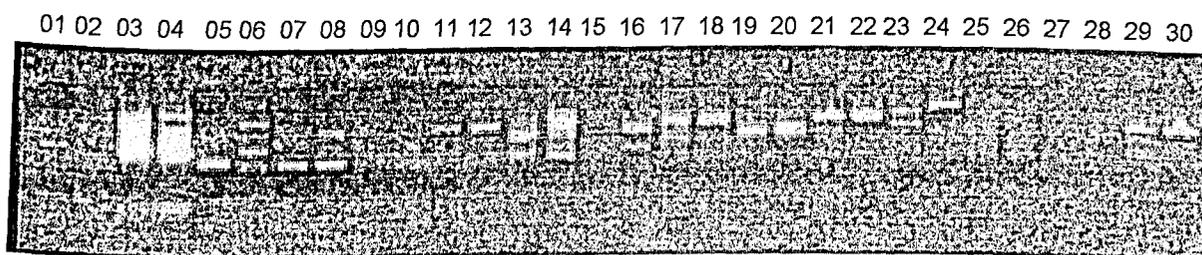


FIGURA 5: Teste de primers com amostras de *Bacillus thuringiensis*. 01 e 02 – GOU05, 03 e 04 – MAU 0801, 05 e 06 OPC09, 07e 08 - OPG15, 09 e 10 – OPG20, 11 e 12 – OPI05, 13 e 14 OPM07, 15 e 16 - OPM09, 17 e 18 - OPM12, 19 e 20 – OPM14, 21 e 22 – OPM18, 23 e 24 – OPM19, 25 e 26 – OPT05, 27 e 28 – OPT09 e 29 e 30 – OPX04.

Cada reação foi amplificada em 3 ciclos de 94° C por 1 minuto, 35° C por 1 minuto e 72° C por 2 minutos mais 34 ciclos de 94° C por 10 segundos, 40° C por 20 segundos 72° C por 5 minutos, conforme citado por OLIVEIRA(1998).

O volume total de cada reação foi de 25µl contendo: 2,5 µl de Tampão da Taq DNA polimerase (Tris-HCl 10 mM(pH 8,0), KCl 50 mM. MgCl₂ 15mM), 3 µl de DNA (10 ng/µl), 0,3 µl de Taq DNA polimerase (5U/µl), 2,5 µl primer (4 pmol/µl), 0,5 µl de desoxiribonucleotídeo trifosfato (10 mM de cada - dATP, dTTP, dCTP e dGTP), completando-se o resto com água ultrapura. Também na reação de amplificação, utilizou-se um controle contendo todos os componentes, exceto o DNA, verificando-se assim possíveis contaminações.

Ao término das reações, os fragmentos de DNA amplificados foram separados por eletroforese em géis de agarose a 1,5%, preparados de acordo com SAMBROOK *et al.*, (1989) e corridos a 150 volts por aproximadamente 2 horas em tampão TBE 0,5 X (Tris-Borato 0,045M e EDTA 0,001 M). Utilizou-se como padrão de peso molecular o 100 pb e 1 Kb DNA ladder.

A cada 12 µl de amostra foi adicionado um tampão de carregamento (azul de bromofenol 3,61 M, xileno cianol 4,64 M, sacarose 1,17 M e EDTA 0,1 M pH8) na proporção de 5:1. Para avaliação, os géis de agarose foram corados com EtBr (0,5µg/ml), observados em transluminador UV e fotografado em Video Documentation System da Pharmacia Biotech usando filtro laranja.

Foi feita uma repetição de amplificação para cada *primer*, para confirmar os padrões de bandas obtidos.

3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Utilizou-se o programa STATISTICA STATSOFT para se efetuar as análises estatísticas e gerar os dendogramas.

Construiu-se uma matriz binária (1/0), onde as bandas presentes foram registradas como 1 e as ausentes como zero. Apenas as bandas mais intensas foram consideradas. Esses dados foram utilizados para determinar a porcentagem de desacordo entre todos os possíveis pares de entrada, com base em PUTERKA *et al.* (1993): Porcentagem de Desacordo (PD) = N_{AB} / N_T , onde N_{AB} é o número total de bandas polimórficas entre os dois genótipos comparados e N_T é o número de bandas. As distâncias genéticas foram baseadas também no percentual de desacordo ou distâncias genéticas comuns (SKROCH *et al.*, 1992). As distâncias genéticas comuns obtidas foram utilizadas para as análises de agrupamento das colônias de *Bacillus thuringiensis* pelo método UPGMA (*Unweighted pair-group method using arithmetic averages*) que é um método não ponderado de agrupamento aos pares utilizando médias aritméticas que agrupa, inicialmente, indivíduos mais similares e assim, sucessivamente, até os indivíduos ou grupos mais distantes.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. SELEÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE CEPAS *Bacillus thuringiensis*

Recolheu-se aproximadamente 370 amostras de solo da região do Triângulo Mineiro e regiões adjacentes, de diferentes localidades. Destas, aproximadamente 314 apresentaram crescimento bacteriano em meio LB com penicilina, sendo selecionadas amostras com aspectos morfológicos diferentes e observadas em microscópio de contraste de fase. Descartou-se as amostras que não apresentavam características típicas de *Bacillus thuringiensis*, bem como algumas que apresentavam contaminações diversas.

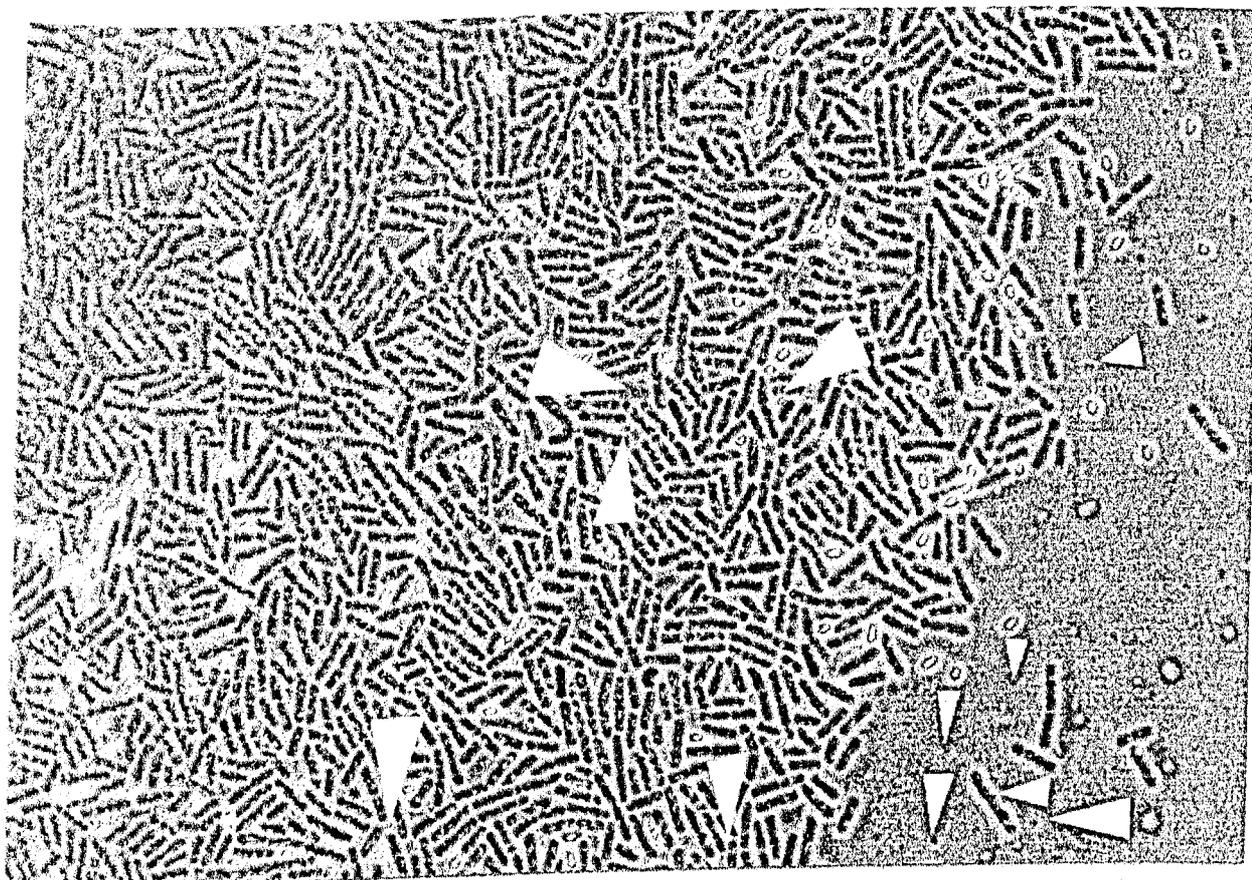


FIGURA 6: Colônia *Bacillus thuringiensis* com setas indicando cristais dentro e fora da bactéria

Utilizou-se de um microscópio de contraste de fase com lente de 100 vezes de aumento visualizando o cristal intracelular caracterizando assim como *Bacillus*

thuringiensis de acordo com HABIB & ANDRADE (1998). O cristal foi visualizado tanto dentro da bactéria como livre no meio líquido (Figura 6).

Estes resultados estão de acordo com a literatura que cita que o *Bacillus thuringiensis* é encontrado em muitos tipos de substratos e em diferentes lugares do mundo (MARTIN & TRAVERS, 1989; SMITH & COUCH, 1991; DULMAGE & AIZAWA, 1982).

4.2. TESTES DE PATOGENICIDADE

Nos testes de patogenicidade efetuados com as 25 amostras de *Bacillus thuringiensis* observou-se que as larvas neonatas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidóptera: Noctuídae) apresentaram mortalidade variando de 0 a 26% conforme indicado na Tabela 6.

Observou-se que certas larvas apresentaram uma acentuada diminuição no desenvolvimento, chegando em alguns casos a 1/5 do tamanho de uma lagarta com o mesmo período de vida. Já nas larvas que sofreram mortalidade, pode-se notar que estas se afastavam da dieta, diminuíam a mobilidade, não reagindo ao toque, adquirindo uma coloração sem brilho e ficando com o tegumento flácido. Este comportamento é explicado por HABIB & ANDRADE (1998), causado por distúrbios no intestino, invasão do patógeno na hemolinfa e acúmulo de alimento mal digerido no intestino.

A causa primária da diferença na susceptibilidade está no espectro de atividade da própria delta-endotoxina. A delta-endotoxina de distintas cepas pode matar diferentes espécies de insetos ou diferir no seu grau de atividade sobre eles. Assim, podem existir cepas efetivas sobre uma mesma espécie, porém com distintos graus de patogenicidade, além do que, cepas que não são evidentemente eficientes para uma determinada espécie podem ser muito ativas sobre outras (DULMAGE, 1981).

TABELA 6: Mortalidade (%) de larvas neonatas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidóptera: Noctuídae) utilizadas em testes de patogenicidade com amostras coletadas no Triângulo Mineiro e a cepa padrão 01 específica para Lepidópteros.

N.	Mort.(%)	Origem	N.	Mort.(%)	Origem
03	0.0	Campina Verde	16	0.0	Uberlândia
04	0.0	Cascalho Rico	17	8.3	Araguari
05	0.0	Monte Alegre	18	26.0	Uberlândia
06	8.3	Capinópolis	19	4.2	Indianópolis
07	0.0	Tupaciguara	20	4.2	Santa Juliana
08	0.0	Grupiara	21	4.5	Nova Ponte
09	0.0	Indianópolis	22	9.0	Monte Carmelo
10	0.0	Prata	23	12.5	Monte Alegre
11	4.2	Araguari	24	16.7	Tupaciguara
12	20.9	Capinópolis	25	8.3	Capinópolis
13	25.0	Monte Alegre	26	4.3	Monte Carmelo
14	8.3	Canápolis	27	0.0	Santa Juliana
15	0.0	São Francisco de Sales	01	65.0	CNPMA-EMBRAPA

Analisou-se através do programa STATISTICA STATSOFT a correlação entre o pH do solo de onde foram retiradas as amostras com o nível de mortalidade destas cepas em *Spodoptera frugiperda* (Lepidóptera: Noctuídae) (TABELA 7). Houve correlação positiva ($r = 0,22$), porém não significativa.

TABELA 7 – pH do solo e mortalidade (%) das amostras retiradas da região do Triângulo Mineiro

AMOSTRAS	pH	MORTALIDADE	AMOSTRAS	pH	MORTALIDADE
			16	5,3	0,0
3	5,2	0,0	17	5,4	8,3
4	6,2	0,0	18	5,8	26,0
5	5,7	0,0	19	5,4	4,2
7	5,8	0,0	20	6,2	4,2
8	5,6	0,0	21	5,6	4,5
9	5,4	0,0	22	6,4	9,0
10	6,2	0,0	23	7,7	12,5
11	5,8	4,2	24	5,9	16,7
12	6,0	20,9	25	6,0	8,3
13	5,7	25,0	26	5,8	4,3
14	6,0	8,3	27	6,1	0,0
15	5,6	0,0			

4.3. DETERMINAÇÃO DA ESPECIFICIDADE INSETICIDA DE *Bacillus thuringiensis* POR PCR

Tanto as bactérias padrão (atividade inseticida conhecida), quanto as bactérias amostradas na região do Triângulo Mineiro, foram cultivadas em meio LB mais penicilina G (que é seletiva para *Bacillus thuringiensis*), em seguida, identificadas em microscópio de contraste de fase com lente de 100 vezes de aumento, constatando-se a presença do cristal protéico (Figura 6). Foram feitos testes de patogenicidade (Tabela 6) com estas bactérias, verificando-se em 60%, níveis variados (0 à 26%) de mortalidade em *Spodoptera frugiperda* (Lepidóptera: Noctuidade). Extraiu-se DNA total de todas as bactérias e montou-se a reação de PCR com os *primers* Universais. Em sequência, aplicou-se o produto amplificado em gel de agarose 2% e visualizou-se em transluminador UV. Os *primers* Universais utilizados na determinação da especificidade não classificaram nenhuma amostra, para as ordens de Díptera, Lepidóptera ou Coleóptera (Figura 7). Somente amplificaram as bactérias padrão. Salienta-se que no processo de otimização dos *primers* (Figura 4), as variações de condições não foram determinantes para a amplificação, pois todas geraram produtos específicos de igual intensidade.

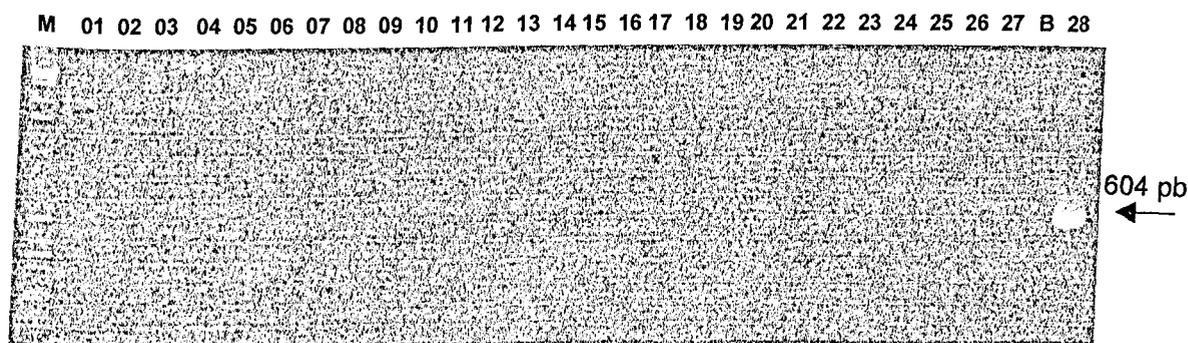


FIGURA 7: Amplificação com *primer* Universal com especificidade para Coleópteros. M – Marcadores 01- *Bacillus thuringiensis* var *Thuringiensis*, 02 – *Bacillus thuringiensis* var *Israelensis*, 03 a 27 – *Bacillus thuringiensis* amostrados na região do Triângulo Mineiro, 28 – *Bacillus thuringiensis* var *Purdue*, B – Branco.

O uso destes *primers* universais é um rápido método para detecção e diferenciação (pelos seus perfis de PCR) de cepas coletadas de *Bacillus thuringiensis* predizendo suas atividades inseticidas para subsequentes ensaios

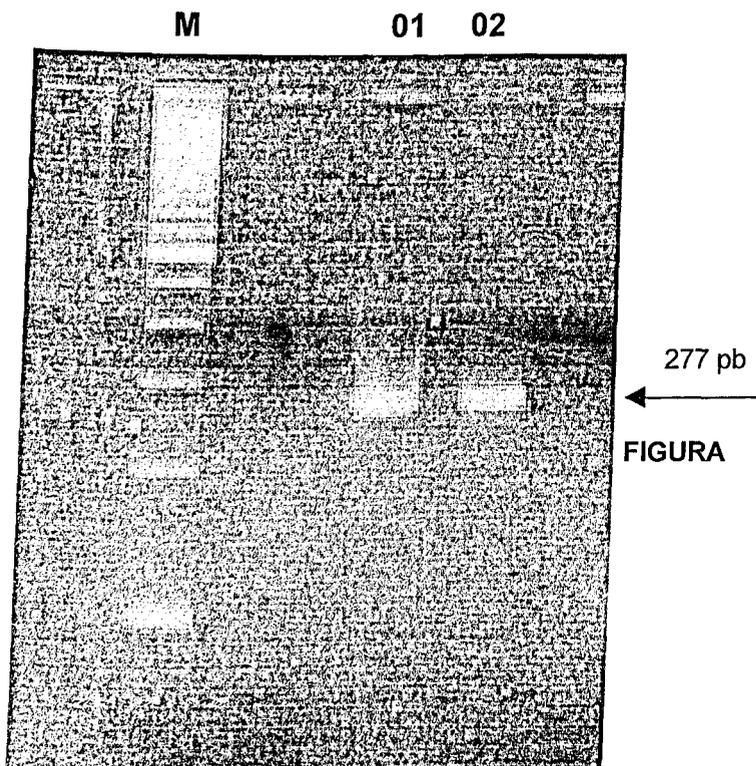


FIGURA 8: Amplificação com *primer* Universal específico para Lepidóptero utilizando as mesmas condições para ambos. M – Marcador, 01 *Bacillus thuringiensis* var *thuringiensis* (Extração de DNA), 02 – *Bacillus thuringiensis* var *thuringiensis* (Cultura líquida)

contra Lepidóptera, Díptera e Coleóptera. Este método enriquece as estratégias de PCR para seleção de conhecidos genes *cry*, não abrangendo novos genes que devem ser sondados com *primers* específicos dentro de cada ordem (BEM-DOV *et al.*, 1997). Como hipótese para a não amplificação de nenhuma amostra coletada na região do Triângulo Mineiro pode ter ocorrido uma mudança no ponto de inserção do *primer*, não permitindo seu anelamento correto e portanto, o surgimento da banda característica no gel de agarose. Esta mudança pode resultar na perda do efeito inseticida da bactéria, bem como o surgimento de uma nova proteína inseticida com efeitos e hospedeiros desconhecidos. VALADARES *et al.* (1998) cita que a associação dos processos de conjugação e mobilização dos genes de delta-endotoxina, mediada pelos elementos móveis adjacentes a estes, pode ter contribuído para a origem da multiplicidade e diversidade das proteínas cristal apresentadas pelas cepas de *Bacillus thuringiensis*. Por sua vez, a diversidade confere um potencial adaptativo extremamente forte a essa bactéria em termos de inseto-alvo.

Em teste de reações de PCR com os *primers* Universais utilizou-se amostras de DNA extraído e amostras da própria cultura líquida da bactéria, nas mesmas condições. Observou-se o mesmo padrão de bandas amplificadas, tanto na amostra de DNA extraído quanto na cultura líquida (Figura 8). WHITELEY & SCHNEPF (1986) cita que em dados obtidos em vários métodos experimentais

(transconjugação, clonagem e hibridização) ficou evidenciado que os genes de cristais protéicos estão localizados em um ou mais plasmídeos. Em alguns casos eles podem estar localizados no cromossomo, esclarecendo portanto, a necessidade de se fazer uma análise de DNA total na determinação da especificidade da bactéria em estudo. Com o uso da cultura líquida pode-se agilizar o processo de busca de novas cepas, não havendo a necessidade de extração de DNA, que além de demorada pode carregar certos riscos como resíduos de fenol que podem inibir a reação de amplificação (ROUX 1995), o que não foi o caso, pois as condições de extração e amplificação foram as mesmas, tanto para as bactérias padrão, como para as amostras.

4.4. DETERMINAÇÃO DE POLIMORFISMOS ENTRE AMOSTRAS DE *Bacillus thuringiensis* UTILIZANDO RAPD-PCR

A princípio as amplificações apresentaram bandas fracas e falhas quando em análise no gel de agarose 1,5%. Adicionou-se então *Purified BSA* (Bovine Serum Albumine), albumina de soro bovino purificada na reação com excelentes resultados (FIGURA 9). O BSA é comumente utilizado como um estabilizador de atividades enzimáticas contra a desnaturação durante o armazenamento, diluições ou reações enzimáticas *in vitro* tais como clivagem de DNA, síntese de cDNA ou ligações. Aparentemente o BSA no ensaio RAPD estabiliza a Taq DNA 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). O BSA (10mg/ml) foi utilizado na proporção de 10% do volume final de cada reação.

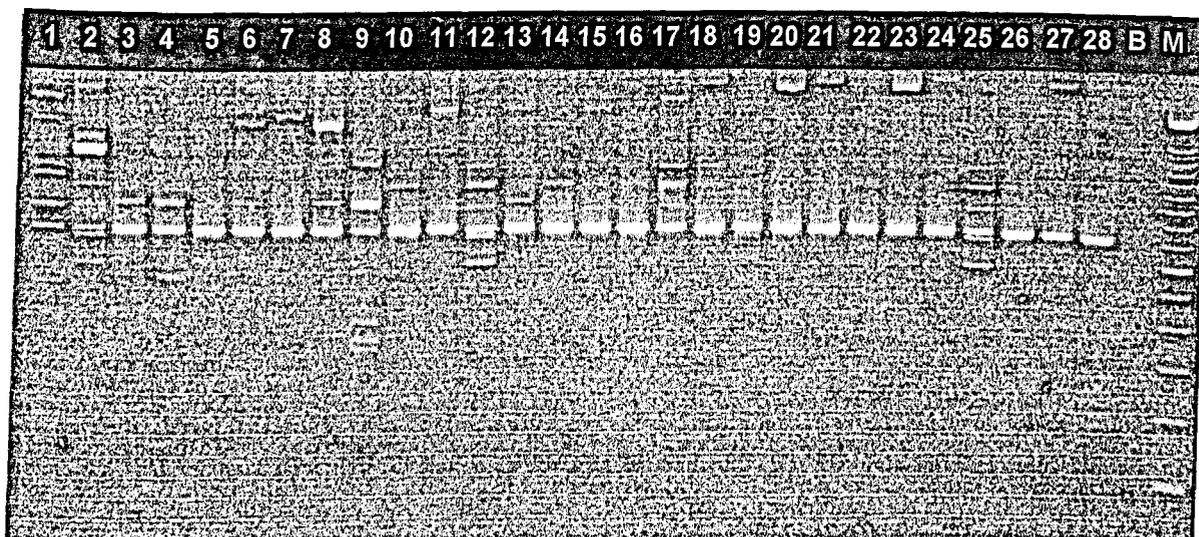


Figura 9 – Padrão de amplificação do primer OPM14. 01 - *Bacillus thuringiensis* var *Thuringiensis*, 02 - *Bacillus thuringiensis* var *Israelensis*, 03 a 27 - *Bacillus thuringiensis* amostrados na região do Triângulo Mineiro, 28 - *Bacillus thuringiensis* var *Purdue*, B - Branco, M - Marcador

Pelo RAPD foram selecionados 13 primers entre as 25 amostras de *Bacillus thuringiensis*, resultando em 190 bandas aproveitáveis, com tamanho variando entre 200 e 2600 pb, sendo apenas uma monomórfica e 189 polimórficas. A Tabela 7 apresenta um resumo das informações geradas por cada primer individualmente.

TABELA 8: Relação do número total de bandas amplificadas, monomórficas e tamanho estimado das bandas por primers para as cepas de *Bacillus thuringiensis*

PRIMER	BANDAS		
	TOTAIS	MONOMÓRFICAS	TAMANHO (pb)
OPC09	13	00	300 - 2100
OPC11	17	00	200 - 2000
OPG15	17	00	300 - 1500
OPI10	10	00	450 - 2300
OPM05	11	00	600 - 2070
OPM07	23	00	250 - 2500
OPM12	14	00	310 - 2100
OPM14	16	01	300 - 2600
OPM18	12	00	470 - 2070
OPM19	16	00	270 - 2300
OPT06	12	00	460 - 2100
OPT13	13	00	300 - 2300
OPX04	16	00	430 - 2300
Total	190	01	

O dendrograma resultante de todos os *primers* mostrou que ao nível de 29% de dissimilaridade genética, houve uma separação das amostras de *Bacillus thuringiensis* em 3 grupos sendo o primeiro constituído do padrão para Lepidóptero (C1) mais 24 amostras e o padrão para Coleóptero, o segundo, 2 amostras das regiões de Indianópolis e Araguari (MG) e o terceiro, separou o padrão para Díptero.

Ao nível de 26% nota-se uma divisão em cinco grupos com o maior deles abrangendo as 22 cepas mais próximas geneticamente do *Bacillus thuringiensis var thuringiensis*, o que mesmo não as caracterizando patogênicas para Lepidópteros, as coloca como integrantes deste grupo que segundo a literatura é o grupo mais abrangente (HOFTE & WHITELEY, 1989).

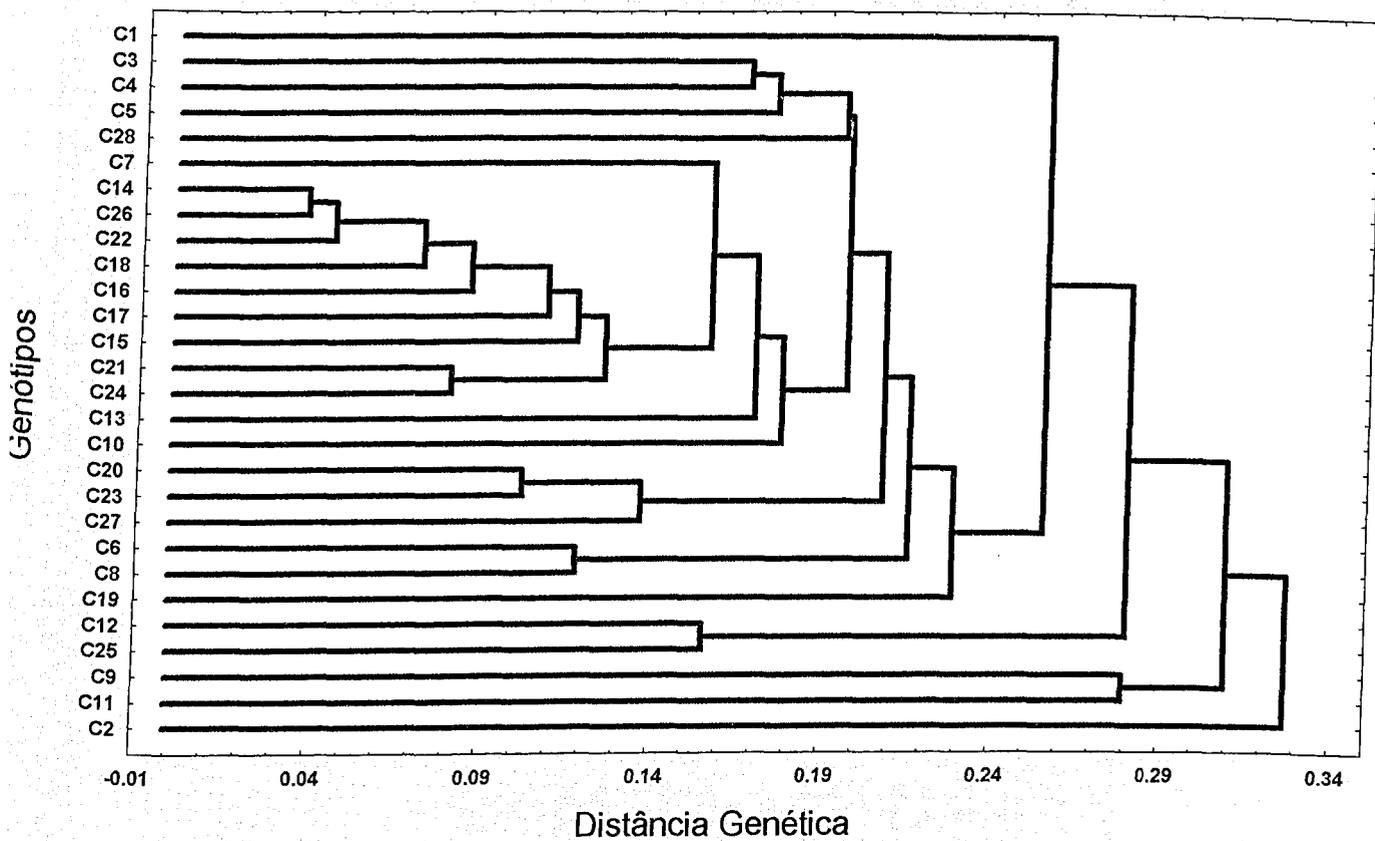


FIGURA 10: Dendrograma representativo da distância genética por Porcentagem de Desacordo e Agrupamento pelo método de UPGMA entre os 28 genótipos (25 amostras e 3 padrões de *Bacillus thuringiensis*) por meio de 189 marcadores RAPD obtidos por 13 *primers* decâmeros. As amostras C1, C2 e C28 abrigam os genes *cry 1* (Lepidópteros), *cry 4* (Dípteros) e *cry 28* (Coleópteros) respectivamente

C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	
1	0,00																												
2	0,32	0,00																											
3	0,22	0,32	0,00																										
4	0,21	0,33	0,17	0,00																									
5	0,24	0,31	0,18	0,17	0,00																								
6	0,23	0,34	0,18	0,16	0,18	0,00																							
7	0,27	0,30	0,18	0,17	0,19	0,16	0,00																						
8	0,29	0,32	0,20	0,23	0,24	0,12	0,20	0,00																					
9	0,32	0,33	0,30	0,31	0,33	0,33	0,30	0,30	0,00																				
10	0,26	0,38	0,24	0,24	0,24	0,20	0,18	0,28	0,37	0,00																			
11	0,29	0,33	0,29	0,23	0,24	0,28	0,26	0,32	0,28	0,31	0,00																		
12	0,32	0,30	0,28	0,28	0,25	0,29	0,23	0,31	0,33	0,33	0,30	0,00																	
13	0,27	0,35	0,21	0,19	0,23	0,23	0,19	0,26	0,35	0,23	0,28	0,26	0,00																
14	0,22	0,29	0,19	0,17	0,20	0,17	0,14	0,25	0,34	0,16	0,30	0,28	0,17	0,00															
15	0,24	0,33	0,23	0,19	0,22	0,20	0,20	0,27	0,37	0,19	0,24	0,33	0,21	0,09	0,00														
16	0,25	0,32	0,21	0,17	0,20	0,19	0,13	0,25	0,35	0,13	0,30	0,28	0,18	0,08	0,13	0,00													
17	0,20	0,29	0,20	0,16	0,19	0,17	0,16	0,24	0,31	0,18	0,28	0,29	0,16	0,09	0,14	0,11	0,00												
18	0,23	0,33	0,20	0,16	0,19	0,18	0,16	0,24	0,35	0,15	0,30	0,31	0,15	0,07	0,12	0,09	0,10	0,00											
19	0,28	0,36	0,23	0,24	0,23	0,25	0,23	0,32	0,34	0,26	0,28	0,33	0,25	0,18	0,21	0,20	0,23	0,18	0,00										
20	0,34	0,39	0,24	0,22	0,27	0,24	0,25	0,28	0,34	0,27	0,30	0,34	0,20	0,21	0,22	0,23	0,23	0,16	0,28	0,00									
21	0,29	0,34	0,18	0,18	0,21	0,18	0,16	0,22	0,34	0,22	0,29	0,30	0,13	0,15	0,18	0,17	0,17	0,11	0,22	0,20	0,00								
22	0,25	0,33	0,20	0,20	0,22	0,18	0,17	0,23	0,34	0,17	0,31	0,30	0,17	0,05	0,12	0,10	0,13	0,07	0,19	0,19	0,11	0,00							
23	0,31	0,38	0,25	0,23	0,27	0,23	0,23	0,27	0,34	0,23	0,31	0,33	0,23	0,17	0,18	0,17	0,20	0,16	0,26	0,10	0,24	0,17	0,00						
24	0,25	0,31	0,18	0,15	0,20	0,17	0,12	0,19	0,32	0,20	0,30	0,30	0,16	0,09	0,13	0,12	0,11	0,09	0,20	0,23	0,08	0,10	0,19	0,00					
25	0,27	0,28	0,28	0,25	0,27	0,25	0,24	0,26	0,33	0,30	0,32	0,16	0,23	0,23	0,27	0,27	0,20	0,24	0,32	0,34	0,29	0,24	0,32	0,25	0,00				
26	0,22	0,32	0,21	0,18	0,22	0,18	0,16	0,23	0,36	0,16	0,32	0,28	0,18	0,04	0,10	0,08	0,11	0,08	0,18	0,22	0,13	0,04	0,18	0,09	0,23	0,00			
27	0,30	0,35	0,18	0,19	0,22	0,21	0,21	0,24	0,32	0,25	0,28	0,32	0,19	0,18	0,20	0,19	0,17	0,17	0,25	0,12	0,18	0,18	0,16	0,17	0,28	0,18	0,00		
28	0,25	0,28	0,21	0,18	0,19	0,20	0,18	0,25	0,27	0,28	0,27	0,27	0,19	0,18	0,22	0,20	0,16	0,19	0,22	0,26	0,20	0,21	0,25	0,16	0,24	0,18	0,19	0,00	

FIGURA 11: Matriz das distâncias genéticas expressa em Porcentagem de Desacordo, obtida para 03 cepas de *Bacillus thuringiensis* (*thuringiensis*, *israelensis* e *purdue*) e 25 cepas amostradas na região do Triângulo Mineiro por meio de 189 marcadores RAPD, gerados por 13 primers decâmeros.

As cepas assinaladas apresentam a maior e menor distância genética registrada.

Quando reuniu-se os dados obtidos com todos os *primers*, obteve-se um total de 189 marcadores, com uma média de 14,5 polimorfismos por *primer* para as cepas. Estes valores demonstram o alto grau de variabilidade desta espécie, o que em parte pode explicar o não anelamento dos *primers* Universais por mudanças que podem ter ocorrido no ponto de anelamento.

Na matriz das distâncias genéticas pode-se notar que a maior porcentagem (39%) ficou entre a cepa 20 (Santa Juliana) e a cepa 2 (*Bacillus thuringiensis* var *israelensis*). Este valor relativamente alto de dissimilaridade genética em parte pode ser explicada pela suposta especificidade da cepa 20 que parece ser para Lepidópteros, já que em teste de patogenicidade ela provocou uma mortalidade de 4,2%, enquanto que a cepa 2 é reconhecidamente específica para Dípteros. Já a dupla que apresentou a menor distância genética (menos de 4%) foram as cepas 14 (Canápolis) e 26 (Monte Carmelo), que se encontram a 26% do grupo mais próximo da cepa 1 (*Bacillus thuringiensis* var *thuringiensis*) reconhecidamente específica para Lepidópteros. Também em testes de patogenicidade as cepas 14 e 26 apresentaram valores baixos (8,3 e 4,3%, respectivamente) de mortalidade em *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuídae).

5. CONCLUSÕES

- 1) Comprovou-se a presença de cepas de *Bacillus thuringiensis* em algumas localidades do Triângulo Mineiro, apresentando uma distância genética num intervalo de 3.75% à 32.76%, caracterizando uma alta variabilidade genética;
- 2) Ao nível de 29% de dissimilaridade genética, houve uma separação das amostras de *Bacillus thuringiensis* em 3 grupos sendo o primeiro - o padrão para Lepidóptero mais 24 amostras e o padrão para Coleóptero, o segundo - 2 amostras das regiões de Indianópolis e Araguari (MG) e o terceiro - o padrão para Díptero;
- 3) Os *primers* Universais não foram eficientes em distinguir, dentro das ordens Coleóptera, Diptera e Lepidóptera, as cepas de *Bacillus thuringiensis* coletadas e selecionadas na região do Triângulo Mineiro, mesmo amplificando as cepas padrão que apresentavam os padrões esperados;
- 4) Algumas cepas da região do Triângulo Mineiro testadas, causaram mortalidade em larvas neonatas de *Spodoptera frugiperda* numa variação de 0 a 26%.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARANTES, O. M. N., MENO, G., SANCHIS, V., AZEVEDO, J. L. & LERECLUS, D., 1990. Cloning of a *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene. **Revista Brasileira de Genética**, v. 13, p. 645-652.
- AZEVEDO, J. L., 1998. 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.
- AZEVEDO, J. L., 1998a. Controle microbiano de insetos-pragas e seu melhoramento genético. In: MELO, I. S. & AZEVEDO, J. L. **Controle Biológico v. 1** 262 p.
- AYALA, F. J. 1983 Genetic polymorphism: from electrophoresis to DNA sequences. **Experimentia** 39: 813-823.
- BEM-DOV, E., ZARITSKY, A., DAHAN, E., BARAK, Z., SINAI, R., MANASCHEROB, R., KHAMARAEV, A., TROITISKAYA, E., DUBITSKY, A., BEREZINA, N. & MARGALITH, Y., 1997. Extended screening by PCR for seven cry-group genes from field-collected strains of *Bacillus thuringiensis*. **App. Environ. Microbiol.** 63: 4883-4890.
- BOEHRINGER MANNHEIM BIOCHEMICA, 1995. **PCR applications manual**. Boehringer Mannheim, 192p.
- BURGESS, H. D., THOMSON, E. M. & LATCHFORD, R. A., 1976. Importance of spores and beta endotoxin protein crystal of *Bacillus thuringiensis* in *Galleria mellonella*. **J. Invertebr. pathol.**, 27: 87-94.
- CAROZZI, N. B., KRAMER, W. G., EVOLA, S., & KOZIEL, M. G., 1991 Prediction of the insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.57. n. 11, p. 3057-3061.
- CERON, J., COVARRUBIAS, A., QUINTERO, ORTIZ, L. R., ORTIZ, A., ARANDA, M., LINA, E., LAURA & BRAVO, A., 1994. PCR analysis of the cryI insecticidal crystal family genes from *Bacillus thuringiensis*. **Appl. Environ. Microbiol.** 60: 353-356.

- CERON, J., ORTIZ, A., QUINTERO, R., GUERECA, L. & BRAVO, A., 1995. Specific PCR primers directed to identify CryI and CryIII genes within *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Appl. Environ. Microbiol.** **61**: 3826-3831.
- CHARLES, J. F. & DE BARJAC, H., 1983 Action des cristaux de *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* sur l'intestin moyen des larves de *Aedes aegypti* L., en microscopie électronique. **Annual Microbiology (Inst. Pasteur)**, v. **134A**, p.197-218.
- CHENG, J., BOLYARD, M. G., SAXENA, R. C. & STICKLEN, M. B., 1992. Production of insect resistant potato by genetic transformation with δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. **Plant. Sci.** **81**: 83-91.
- VALICENTE, F. H. & CRUZ, I., 1991. **Controle biológico da lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda*, com baculovirus**, Sete Lagoas: EMBRAPA, 23p.
- CHILCOTT, C. N. & WIGLEY P. J., 1994. Opportunities for finding new *Bacillus thuringiensis* strains. **Agric. Ecosist. Environm.** **49**: 51-57
- DE BARJAC, H. & DEDONDER, R., 1965. Isolement d'un nucleotide identifiable à la toxine thermostable de *Bacillus thuringiensis* Berliner. **C. R. Acad. Sci.**, **260**: 7050-7053.
- DULMAGE, H. T., 1981. Insecticidal Activity of Isolates of *Bacillus thuringiensis* for Pest Control. EN: **Microbial Control of Pests and Plants Diseases**. Academic Press, ET. H.D. Burges.
- DULMAGE, H. T. & AIZAWA, K. 1982. Distribution of *Bacillus thuringiensis* in Nature. P. 209-237. I. E: KURSTAK (ed.), **Microbial & Viral Pesticides**. Marcel Dekker. Inc.; New York.
- FERREIRA, M. E. & GRATTAPAGLIA, D., 1998. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**, 3^a ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN. pp. 220.
- FISCHHOFF, D. A., BOLDISH K. S., PERLAK F. J., MARRONE P. G., MCCORMICK S. M., NIEDERMEYER J. G., DEAN D. A., KUSANO-KRETZMER K., MAYER E. J., ROCHESTER D. E., ROGE R. S. & FRALEY, R. T., 1987. Insect tolerant transgenic tomato plants. **Biotechnol.** **5**: 807-813.

- FUJIMOTO, H., ITOH, K., YAMAMOTO, M., KYOZUKA, J. & SHIMAMOTO, K., 1993. Insect resistant rice generated by introduction of a modified δ -endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis*. **Biotechnol.** **11**: 1151-1155.
- GARCIA, M. A. **Potencialidade de alguns fatores bióticos e abióticos na regulação populacional de *Spodoptera frugiperda*** (Abbot e Smith, 1797 – Lepidoptera, Noctuidae), Tese de Mestrado, Campinas, 1979.
- GILL, S. S., COWLES, E. A., PIETRANTONIO, P. V., 1992 The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. **Annu. Rev. Entomol.** **v. 37**: 615-636.
- GINGRICH, R. E., ALLAN, N. & HOPKINS, D. E., 1974. *Bacillus thuringiensis*. Laboratory tests against 4 species of biting lice (Mallophaga, Thichodectidae). **J. Invertebr. Pathol.** **23**: 232-236.
- GRIGOROVA, R., 1964. Deux souches de *Bacillus thuringiensis* Berliner isolées de chenilles du *Bombyx dispar* *Lymantria dispar*, **Entomophaga Mein.**, **2**: 179-191.
- GRODZICKER, T.; WILLIAMS, J.; SHARP, P. & SAMBROOK, J. 1974 Physical mapping of temperature-sensitive mutations of adenoviruses. **Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.** **39**: 439-446.
- HABIB, M. E. M. & ANDRADE, C. F. S., 1986. Bactérias Entomopatogênicas. In: ALVES, S. B. **IN: Controle Microbiano de Insetos**, - Editora Manole Ltda, São Paulo, SP.
- HABIB, M. E. M. & ANDRADE, C. F. S., 1998. Bactérias Entomopatogênicas. In: ALVES, S. B. **Controle Microbiano de Insetos**, 2ed. FEALQ, Piracicaba, SP.
- HANNAY, C.L., 1953. Crystalline inclusions in aerobic sporofforming bacteria. **Nature**, **172**: 1004.
- HANSEN, B. M., DAMGAARD, P. H., EILENBERG, J. & PEDERSEN, J. C., 1998. Molecular and phenotypic characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from leaves and insects. **J. Invertebr. Pathol.** **71(2)**: 106-14.
- HENDRICKX, K., DELLOF, A. & VAN MELLAERT, H., 1990. Effects of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin on the permeability of brush border membrane vesicles from tobacco hornworm (*Manduca sexta*) midgut. **Comprehensive Biochemistry and Physiology**, **v. 95C**, p. 241-245.

- HÖFTE, H. & WHITELEY, H. R., 1989. Insecticidal crystal of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiological Reviews**. **53**: 242-255.
- HU, J. & QUIROS, C. E., 1991. Identification of broccoli and cauliflower with RAPD markers. **Plant Cell Reprot** **10**: 505-511.
- JANSEN, S., DE CLERCQ, R., REYNAERTS, A. & PEFEROEN, M., 1992. Greenhouse evaluation of transgenic tomato plants, expressing a *Bacillus thuringiensis* crystal protein, for control of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Mededelingen-van-de-Facult. Land. Univ. Gent** **57**:515-522.
- JUTSUM, A. R., 1988. Commercial application of biological control: status and prospects. In: WOOD, R. K. S., WAY, M. J. ed. **Biological control of pests, pathogens and weeds: development and prospects**. London: The royal Society, London, p. 247-263.
- KALMAN, S., KIEHNE, K. L., LIBS, J. L. & YAMAMOTO, T., 1993. Cloning os a novel *cryIC*-type gene from a strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *galleriae*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.59, n.4. p.1131-1137.
- KASTEN, P. JR., PRECETTI, A. A. C. M. & PARRA, J. R . P., 1978. Dados biológicos comparativos de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) em duas dietas artificiais e substrto natural. **Revista de Agricultura, Piracicaba**, **53 (1-2)**:68-78.
- KOZIEL, M. G., BELAND, G. L., BOLUMAN, C., CAROZZI, N. B., CRENSHAW, R., CROSSLAND, L., DAWSON, J., DESAI, N., HILL, M., KADWELL, S., LAUNIS, K., LEWIS, K., MADDOX, D., MACPHERSON, K., MEGHJI, M. R., MERLIS, E., RHODES, R., WARREN, G. W., WRIGHT, M. & EBORA, R. V.. 1992. Field performance of elite transgenic maize plantas expressing na insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. **Biotechnol.** **11**: 194-200.
- KRIEG, A. & FRANZ, J., 1959. Verniche zur Bekämpfung vou waschsmatten mittels Bakteriose. **Naturwisseus. Chafften**, **1**: 22-23.
- LERECLUS, D., DELÉCULSE, A. & LECADET, M. M., 1993. Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. In: ENWISTLE, P. F., CORY, J. S., BAILEY, M. J. & HIGGS, S. ed ***Bacillus thuringiensis*, na environmental biopesticide: theory and practice**. West Sussex: John Widley, . p 37-69.

- LOWE, T., SHAREFKIN, J., YANG, S. Q. & DIEFFENBACH, C. W., 1990. A computer program for selection of oligonucleotides for polymerase chain reaction. **Nucleic Acids Research** **18(7)**: 1757-1761.
- MARTIN, P. A. W. & TRAVERS, R. S., 1989. Worldwide Abundance and Distribution of *Bacillus thuringiensis* Isolates. **Appl. Environ. Microbiol.**, **55**, 2437-2442.
- MEUNIER, J. R. & GRIMONT, P. A. D. 1993. Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. **Res. Microbiol.** **144**: 373-379.
- MICHELMORE, R. W., PARANI, I. & KESSELI, R. V., 1991. Identification of markers linked to disease resistance gene by bulked segregant, analysis: a rapid method to detect markers in specific regions using segregating populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences** **88**: 9829-9832.
- MULLIS, K. & FALLONA, F. 1987 Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalysed chain reaction. **Methods Enzymol.** **55**:335-350.
- OLIVEIRA, R. C., 1998. **Divergência genética por marcadores RAPD em *Tetragonisca angustula* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae)** Tese de Mestrado, Universidade Federal de Uberlândia, 50 p.
- PARAN, I., KESSELI, R. & MICHELMORE, R. 1991 Identification of restriction fragment length polymorphisms linked to genes controlling soluble solids content in tomato fruit. **Theor. Appl. Genet.** **73**: 350-356.
- PARRA, J. R. P. & S. M. CARVALHO, 1984. Biologia e nutrição quantitativa de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) em meios artificiais compostos de diferentes variedades e feijão. **Anais da SEB**, **13(2)**:305-319.
- PERLAK, F. J., R. L. FUCHS, D. A. DEAN, S. L. MCPHERSON & D. A. FISCHHOFF. 1991. Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **88**:3324-3328.
- PUTERKA, G. J., BLACK IV, W. C., STEINER, W. M. & BURTON, R. L., 1993. Genetic variation and philogenetic relationships among worldwide collections of the Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia* (Mordvilko), inferred from allozyme and RAPD-PCR markers. **Heredity v. 70**: p. 604-618.

- REITER, R. S., WILLIAMS, J. G. K., FELDMANN, K. A., RAFALSKI, J. A., TINGEY, S. V. & SCOLNIK, P. A., 1992. Global and local genome mapping in *Arabidopsis thaliana* by using recombinant inbred lines and random amplified polymorphic DNA. **Proc. Natl. Acad. Sci.** **89**: 1477-1481.
- ROUX, K. H., 1995. Optimization and troubleshooting in PCR. **PCR Methods and Applications** **4(5)**: S185-S194.
- SACCHI, V. F., PARENTI, P., HANOZET, G. M., GIORDANA, B., LÜTHY P. & WOLFERSBERGER, 1986. M. *Bacillus thuringiensis* toxin inhibits K⁺-gradient-dependent amino acid transport across the brush border membrane of *Pieris brassicae* midgut cells. **FEBS Letters**, v. **204**, p. 213-218.
- SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STOEFFEL, S.; SHCARF, S. J.; HIGUCHI, G.; HORN, G. T.; MULLIS, K. B. & ERLICH, H. A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science** **239**:487-491.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F. & MANIATIS, T., 1989. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SANCHIS, V. D., LERECLUS, G., MENOUE, J., CHAUFoux, S., GUO & LECATED, M. M., 1989. Nucleotide sequence and analysis of the N-terminal coding region of the *Spodoptera*-active delta endotoxin of *Bacillus thuringiensis aizawai* 7.29. **Mol. Microbiol.** **3**: 229-238.
- SCHIERWATER, B. & ENDER, A. 1993. Different thermostable DNA polymerases may amplify different RAPD products. **Nucl. Acid. Res.** **21**: 4647-4648.
- SEKAR V., THOMPSON, D. V., MARONEY, M. J., BOOKLAND, R. G. & ADANG, M. J., 1987. Molecular cloning and characterization of the insecticidal crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **V.84**: p.7036-7040.
- SHAIKH, M. U. & F. O. MORRISON, 1966. Susceptibility of nine insect species to infection by *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*. **J. Invert. Pathol.**, **8**: 347-350.
- SHIN, B. S., PARK, S. H. CHOI, S. K., KOO, B. T., LEE, S. T. & KIM, J. I., 1995. Distribution of cryV-type insecticidal protein genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* and *Bacillus thuringiensis* subsp. *entomocidus*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. **61**, n. 6, p. 2402-2407,

- SKROCH, P., TIVANG, J. & NIENHUIS, J. 1992. **Analysis of genetic relationships using RAPD marker data.** Proceeding of symposium – Applications of RAPD technology to plant breeding. Minneapolis, Minnesota (USA), p. 26-30.
- SMITH, R. A. & COUCHE, G. A. 1991. The Phylloplane as a Source of *Bacillus thuringiensis* Variants. **Appl. Environ. Microbiol.**, **57**,311-315.
- SOSA-GÓMEZ, TIGANO, M. S. & ARANTES, O. M. N., 1998. Caracterização de entomopatógenos. In: ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos.** p. Piracicaba, Editora Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz.
- TABASCHNIK., B. E., 1992 Evaluation of synergism among *Bacillus thuringiensis* toxins. **Appl. Environ. Microbiol.** v. **58**, p.3343-3346.
- TAILOR, R., TIPPET, J., GIBB, G., PELLIS, S., PIKE, D., JORDAN, L. & ELY, S. L., 1992 Identification and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxinas entomocidal to coleopteran and lepidopteran larvae. **Molecular Microbiology**, v.6, n.9, p. 1211-1217.
- THANABALU, T., HINDLEY, J., BRENNER, S., OEI, C. & BERRY, C., 1992. Expression of the mosquitocidal toxins of *Bacillus sphaericus* and *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* by recombinant *Caulobacter crescentus* a vehicle for biological control of aquatic insect larvae. **Appl. Environ. Microbiol.** v. **58**, p. 905-910.
- TOUMANOFF, C., 1953. Description de quelques souches entomophytes de *Bacillus cereus* Fr. e Fr. avec remarques sur le jaune d'oeuf. **Ann. Inst. Pasteur**, **85**: 512-516.
- VALADARES, M. C. C., SHILER, W., DE-SOUZA, M. T., 1998. Engenharia genética de microrganismos agentes de controle biológico. In: MELO, I. S. & AZEVEDO, J. L. **Controle Biológico** v. 1 262 p.
- VANKOVA, J., 1964, *Bacillus thuringiensis*. **P. Ang. Entomol**, **2**: 271-291
- WANG, H., FLIECEL. L., CASS, C. E., PENN, A. M. W., MICHALAK, M. WEINER, J. H., LEMIRE, B. D., 1994 Primers are decisive for sensitivity of PCR. **Bio Techniques** **17(1)**: 82-87.
- WELSH, J. & MACCLELLAND, M., 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucl. Acid. Res.** **18**: 7213-7218.

- TELEY, H. R. & SCHNEPF, H. E., 1986. The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. **Annu. Rev. Microbiol.** **40**: 549-576.
- LIAMS, J. G. K., KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A. & TINGEY, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucl. Acid. Res.** **18**: 6531-6535.
- TWER, C. T., FILLMORE, G. C., GARLING, D. J., 1990. Minimizing the time required for DNA amplification by efficient heat transfer to small samples. **Analytical Biochemistry** **186**: 328-331.
- TWER, C. T. & GARLING, D. J. 1991. Rapid cycle DNA amplification: time and temperature optimization. **Bio Techniques** **10**(1):76-83.

FU-00010109-9