



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ESTIRPES DE *Bacillus***  
***thuringiensis* EFETIVAS CONTRA *Diatraea saccharalis* (FABR. 1794)**  
**(LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)**

**CRISTINA LIMA DE MACEDO**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM AGRONOMIA**

**BRASÍLIA/DF**  
**MARÇO/2012**



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

**SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ESTIRPES DE *Bacillus thuringiensis* EFETIVAS CONTRA *Diatraea saccharalis* (FABR. 1794)  
(LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)**

**CRISTINA LIMA DE MACEDO**

**ORIENTADORA: ROSE GOMES MONNERAT  
CO-ORIENTADORA: ÉRICA SOARES MARTINS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM AGRONOMIA**

**PUBLICAÇÃO: 042/2012**

**BRASÍLIA/DF  
MARÇO/2012**



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

**SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ESTIRPES DE *Bacillus thuringiensis* EFETIVAS CONTRA *Diatraea saccharalis* (FABR. 1794)  
(LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)**

**CRISTINA LIMA DE MACEDO**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM AGRONOMIA.**

**APROVADA POR:**

---

**ROSE GOMES MONNERAT, Dra. PhD. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia,  
(ORIENTADORA) CPF: 512.803.701-06  
E-mail: rose@cenargen.embrapa.br**

---

**MARIA LUCRÉCIA GEROSA RAMOS, Dra. PhD. Universidade de Brasília,  
(EXAMINADOR (A) INTERNO) CPF: 002.094.438-12  
E-mail: lucrecia@unb.br**

---

**PAULO ROBERTO QUEIROZ, Dr. PhD. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia,  
(EXAMINADOR EXTERNO) CPF: 564.300.601-44  
E-mail: pqsilva@uol.com.br**

**BRASÍLIA/DF, 30 de MARÇO de 2012.**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Macedo, Cristina Lima

Seleção e caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra *Diatraea saccharalis* (Fabr. 1794) (Lepidoptera: Crambidae). / Cristina Lima de Macedo; orientação de Rose Gomes Monnerat. – Brasília, 2012.

64 p.

Dissertação de Mestrado (M) – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2012.

1. *Bacillus thuringiensis* 2. *Diatraea saccharalis* 3. Cana-de-açúcar. 4. Poteínas Cry.  
I. Monnerat, R. II. Seleção e caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra *Diatraea saccharalis* (Fabr. 1794) (Lepidoptera: Crambidae).

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

MACEDO, C. L. **Seleção e caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra *Diatraea saccharalis* (Fabr. 1794) (Lepidoptera: Crambidae).** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2012, 64 p. Dissertação de Mestrado.

## CESSÃO DE DIREITOS

NOME DO AUTOR: Cristina Lima de Macedo

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: **Seleção e caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra *Diatraea saccharalis* (Fabr. 1794) (Lepidoptera: Crambidae).**

GRAU: MESTRE

ANO: 2012

É concedida à Universidade de Brasília de Brasília permissão para reproduzir cópias desta dissertação de mestrado para única e exclusivamente propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citada à fonte.

---

Nome: Cristina Lima de Macedo

CPF: 053.656.374-88

Email: crispepi@yahoo.com.br

*Dedico,*

*À Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades e mostrar os caminhos nas horas incertas.*

*Aos meus pais, Francisco Pepino de Macedo e Adelaide Maria Ferreira de Lima, que me propiciaram uma vida digna onde eu pudesse crescer, acreditando que tudo é possível, desde que sejamos honestos, íntegros de caráter e que mesmo longe estiveram sempre presentes me apoiando e me incentivando a alcançar meus objetivos.*

*Dedico também a meus irmãos, Leonardo e Linardo, principalmente pela alegria de vivermos em família acima de tudo nos amando.*

*Às minhas cunhadas, Carol e Ana Cláudia pela torcida, trocas de experiência e hospitalidade;*

*À minha orientadora, Dr<sup>a</sup> Rose Monnerat, pela oportunidade de fazer parte da família LBE, pela paciência, confiança, pelos valiosos ensinamentos e incentivos, pelo exemplo de dedicação e de amor à ciência.*

## Agradecimentos

“Nunca atribua a você o sucesso desta ou daquela tarefa, compreendendo que em todo trabalho há que considerar o espírito de equipe.”

André Luiz (Chico Xavier)

À Deus, por me permitir acordar a cada novo dia de muitas bênçãos.

À minha família, pelos momentos de união, amor, pelo apoio incondicional, força, incentivo e amizade sem igual. Sem eles nada disto seria possível. Em especial às minhas tias Alice, Alaíde e Albertina pelo amor e atenção de sempre.

Aos meus pais, pelo exemplo de pessoas que são, pela dedicação, amor e carinho. Vocês são tudo na minha vida!

Aos meus irmãos, Leonardo e Linardo, pela paciência, pelos momentos vividos em família, por serem meus amigos, companheiros e acima de tudo, minha família.

À minha priminha Izadora, por saber que mesmo longe estou presente nos seus dias e compreender que a distância não limita o amor a ela proporcionado.

Às minhas amigas de graduação Kellyn e Cinthya que mesmo longe estiveram presentes nesta caminhada, meu muito obrigado pelo carinho, pelos momentos de descontração, amizade e incentivo. Vocês fazem parte do meu coração!

Aos meus amigos que compartilham comigo a mesma experiência de estar longe de casa e de seus familiares: Ticiania, Alessandra, Edilson, Vanessa, Ismail, Ariane, Renatinha e Ludoviko.

Agradeço com muito carinho à Renatinha, Dani e Edylaine. Muito obrigada por me acolherem com tanta gratidão e carinho!

À todos do LBE: Edylaine, Laura, Aldaléia e Eleny, pelos longo e prazeroso tempo de convivência; Murilo (*in memorian*) por todo apoio, pela oportunidade de ter convivido e aprendido o nobre sentimento de uma fraterna amizade; Zezinho, pelo apoio técnico e paciência; Luciana, Guilherme, Felipe, Anita, Lunalva, Gabi, Juliana, Fernanda, Tati, Clara e Elias pela amizade, conversas e companheirismo.

À Dra. Érica, pela paciência, conhecimentos e confiança adquiridos, por toda ajuda e amizade. Muito obrigada!

Ao Vínicius, pelas palavras amigas, puxões de orelha, paciência, sugestões e dicas importantíssimas para a execução deste trabalho.

À Lílian e ao Dr. Paulo, pelo aprendizado, ajuda e profissionalismo a ser seguido, muito obrigada!

Um agradecimento a todos os colegas que fazem parte do Prédio do Controle Biológico: Isabella, Diogo, Renata, Luciana, Saluana, Silas, Magno pelos momentos de descontração e amizade.

A todos os colegas e professores da pós-graduação em Agronomia pelo convívio e aprendizado. Em especial, Thássya e Klênia, pela amizade, pelas horas de conversas, momentos de estudo compartilhados, risos e convivência nesses dois anos de trabalho.

A professora Maria Lucrecia por importantes sugestões durante a Qualificação.

Aos técnicos da Embrapa Tabuleiros Costeiros – Maceió/Al, pelo envio dos ovos importantes para os bioensaios.

À Capes pelo suporte financeiro à pesquisa.

Enfim, agradeço a todos os familiares, amigos e profissionais que de alguma forma se fizeram presentes e contribuíram para a conclusão desta etapa de minha vida. A todos muito obrigada!

Aprendi a agradecer por tudo, principalmente nas situações mais difíceis, pois elas também vêm para me abençoar de alguma forma.

**Grata, simplesmente grata!**

# SUMÁRIO

## ***ÍNDICE GERAL***

Dedicatória

Agradecimentos

Índice Geral vii

Índice de Figuras xi

Índice de Tabelas xii

Lista de Abreviaturas xiii

**1. INTRODUÇÃO GERAL** 1

**2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA** 3

2.1 A cana-de-açúcar 3

2.2 *Diatraea saccharalis* (Broca-da-cana) 3

2.3 *Bacillus thuringiensis* 6

2.3.1 Características gerais 6

2.3.2 Toxinas produzidas pelo *Bacillus thuringiensis* 7

2.3.3 Modo de ação 9

**3. OBJETIVOS** 12

3.1 Objetivo Geral 12

3.1 Objetivo específico 12

**4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** 13

Capítulo único



SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ESTIRPES DE <i>Bacillus thuringiensis</i> EFETIVAS CONTRA <i>Diatraea saccharalis</i> (FABR. 1794) (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)	21
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	24
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b>	26
2.1 Insetos	26
2.2 Seleção das estirpes de <i>Bacillus thuringiensis</i>	26
2.3 Testes de patogenicidade	27
2.3.1 Bioensaio seletivo	27
2.3.2 Determinação da concentração letal necessária para matar 50% da população testada (CL <sub>50</sub> )	28
2.4 Caracterização bioquímica	30
2.5 Caracterização molecular	31
2.6 Purificação, solubilização e quantificação das proteínas	35
2.7 Ativação das proteínas com tripsina	36
2.8 Biotinilação das proteínas	36
2.9 Ativação das proteínas com proteases (suco gástrico)	37
2.10 Extração das “Brush Border Membrane Vesicles” (BBMVs)	37
2.11 Ensaios de ligação das toxinas Cry aos receptores de membrana intestinais (BBMV’s)	38
<b>3. Resultados e discussão</b>	39
3.1 Insetos	39
3.2 Seleção de estirpes	39
3.3 Caracterização bioquímica e molecular das estirpes de Bt	43

3.4 Bioensaios utilizando proteínas Cry individuais	47
3.5 Ativação das proteínas com tripsina e proteases	49
3.6 Biotinilação das proteínas Cry	51
3.7 Ensaio de ligação das toxinas Cry aos receptores de membrana intestinais (BBMV's)	51
<b>4. CONCLUSÕES</b>	<b>54</b>
<b>5. PERSPECTIVAS</b>	<b>56</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>57</b>

## Índice de Figuras

- Figura 1.** Fases de desenvolvimento de *D. saccharalis*. A) Ovos; B) Lagarta de quarto ínstar; C) Pupa D) Inseto a) Fêmea; b) Macho 4
- Figura 2.** Modo de ação das toxinas Cry1A para lepidóptero descrito por Bravo *et al.*, 2007. Modelo do modo de ação das toxinas Cry e Cyt. A, interação sequencial das toxinas Cry com diferentes receptores moleculares em larvas de lepidópteros. (1) Solubilização e ativação da toxina; (2) Ligação da toxina monomérica ao primeiro receptor (Caderina ou GCR), uma mudança conformacional da toxina e ocorre a clivagem da hélice  $\alpha$ -1; (3) Ligação da toxina oligomérica ao segundo receptor (GPI-APN ou GPI-ALP) e mudança conformacional da proteína; (4) Inserção da estrutura oligomérica na membrana e formação do poro. 10
- Figura 3** SDS-PAGE 12% do complexo esporo-cristal das estirpes de *B. thuringiensis* S602, S1264 e S1301. 1: Marcador Invitrogen Bench Marker™ Prestained Protein Ladder; 2: S602; 3: S1264 e 4: S1301 44
- Figura 4 A:** Ativação das proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa com tripsina (SDS-PAGE a 12%). 1: marcador de massa molecular Rainbow da GE, 2: proteína Cry1Aa ativada, 3: proteína Cry1Ab ativada, 4: proteína Cry1Ac ativada e 5: proteína Cry2Aa ativada. **B:** Ativação das proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa com protease (SDS-PAGE a 12%). 1: proteína Cry1Aa ativada com protease, 2: proteína Cry1Ab ativada com protease, 3: proteína Cry1Ac ativada com protease, 4: proteína Cry2Aa ativada com protease e 5: marcador de massa molecular Rainbow da GE 50
- Figura 5-** Biotinilação das proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa (SDSPAGE a 12%). 1: marcador Biotinylated High range (BioRad); 2: proteína Cry1Aa ativada e biotinilada, 3: proteína Cry1Ab ativada e biotinilada, 4: Proteína Cry1Ac ativada e biotinilada e 5: proteína Cry2Aa ativada e biotinilada. 51
- Figura 6-** Proteínas ativadas e biotiniladas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa aos receptores intestinais da *Diatraea saccharalis*. Os sinais positivos indicam a ligação das proteínas aos receptores. 52

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Diluições e concentrações finais utilizadas no bioensaio de dose contra <i>D. saccharalis</i>	29
<b>Tabela 2.</b> Características dos iniciadores utilizados nas reações de PCR	32
<b>Tabela 3</b> Estirpes testadas, sorotipo e toxicidade à <i>D. saccharalis</i>	40
<b>Tabela 4.</b> Estirpes que apresentaram mortalidade superior a 75% em 24 horas contra larvas de segundo ínstar de <i>D. saccharalis</i> .	42
<b>Tabela 5.</b> CL <sub>50</sub> das estirpes de <i>B. thuringiensis</i> contra larvas de segundo ínstar de <i>D. saccharalis</i>	43
<b>Tabela 6.</b> Perfis protéicos e conteúdo gênico presentes nas estirpes de <i>Bacillus thuringiensis</i>	46
<b>Tabela 7.</b> CL <sub>50</sub> das estirpes avaliadas e intervalo de confiança a 95% do bioensaio de dose das proteínas Cry de <i>B. thuringiensis</i> tóxicas à <i>D. saccharalis</i> .	48

## Lista de Abreviaturas e Siglas

B	Beta
BBMV <sub>s</sub>	Brush-border membrane vesicle – vesículas da borda escovada da membrana apical de células do intestino
BSA	Albumina Sérica Bovina
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
CaCl <sub>2</sub>	Cloreto de cálcio
CADR	Caderina
CL <sub>50</sub>	Concentração Letal que mata 50% da população testada
cm <sup>2</sup>	Centímetros quadrado
Cm	Centímetro
°C	Graus Celsius
D	Dalton
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNTP <sub>s</sub>	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DTT	Ditiotreitol
dH <sub>2</sub> O	Água destilada
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
EGTA	Ácido etileno glicol tetracético
Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ).7H <sub>2</sub> O	Sulfato ferroso heptahidratado
Fig.	Figura
G	Gram
g/mL	Gram/mililitro
GPI	Glicosil Fosfatidil Inositol
H	Horas
HCl	Ácido clorídrico
HEPES	Acido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2'-etanossulfônico
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido sulfúrico
Kb	Quilo bases (1000 pares de bases)
KCl	Cloreto de potássio
kDa	Quilodalton
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Diidrogenofosfato de potássio
L	Litro
M	Molar
mA	Miliampère
Mg	Miligrama
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Sulfato de magnésio heptahidratado
Min	Minuto

mL	Mililitro
Mm	Milímetro
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	Cloreto de Manganês Tetra hidratado
m/v	Massa/ Volume
NaCl	Cloreto de sódio
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Carbonato de sódio
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato de sódio anidro
NaOH	Hidróxido de sódio
Ng	Nanograma = 10 <sup>-9</sup> grama
PA	Para análise
PBS	Phosphate buffered saline ou tampão fosfato-salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	potencial hidrogeniônico
PMSF	Fenilmetilsulfonil fluoride
RNA	Acido ribonucléico
RPM	rotação por minuto
S	Segundo
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturado com SDS
Subsp.	Subespécie
Tab.	Tabela
TBE	Tris-base
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil etilenodiamina
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
Tris-HCl	Tris aminometano-ácido clorídrico
UV	Ultravioleta
V	Volt
v/v	Volume/volume
x g	Velocidade de sedimentação em unidade gravitacional
Δ	Delta
Mg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micromolar (micromol por litro)
Mm	Micrómetro
%	Porcentagem
±	Mais ou menos
-	Menos

## RESUMO

*Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794; Lepidoptera: Crambidae) é responsável por perdas econômicas nas lavouras afetando a cultura e o aproveitamento industrial da cana-de-açúcar. Seu hábito alimentar gera dificuldade no seu controle causando impactos à cultura canavieira. O desenvolvimento de novas estratégias para o seu controle de extrema importância. Uma alternativa para o controle desses insetos é a utilização de agentes de controle biológico, como *Bacillus thuringiensis* (Bt), pois esta bactéria sintetiza diferentes proteínas tóxicas a muitas pragas. Este estudo teve como objetivo, selecionar 106 estirpes da coleção de Bactérias de Invertebrados da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia tóxicas à broca-da-cana. As estirpes selecionadas foram caracterizadas por métodos bioquímicos, moleculares e a ligação das toxinas aos receptores presentes no intestino médio das larvas de *D. saccharalis* foi analisada. Foram selecionadas três estirpes de *B. thuringiensis*, denominadas S602, S1264 e S1301, que apresentaram atividade contra *D. saccharalis*. A caracterização do perfil protéico revelou a presença de proteínas de 130 e 65 kDa, que correspondem às toxinas Cry1 e Cry2, respectivamente. A caracterização molecular mostrou a existência dos genes *cry1* e *cry2*, corroborando com os resultados mostrados no perfil protéico. As proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa expressas individualmente por estirpes de Bt foram purificadas, solubilizadas, ativadas com tripsina e biotinizadas para a realização de ensaios de ligação para a observação da ligação da proteína à microvilosidades do intestino do inseto. A CL<sub>50</sub> das proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa variou entre 222 e 610 ng/cm<sup>2</sup>. As mesmas apresentaram resultados de toxicidade significativamente semelhantes. As estirpes tóxicas selecionadas neste trabalho e o padrão apresentaram CL<sub>50</sub> entre 8 e 43 ng/cm<sup>2</sup> bastante inferior e significativamente diferente do das toxinas puras, indicando haver sinergismo entre as toxinas. Os resultados dos ensaios de ligação aos receptores de membrana intestinais mostraram, pela primeira vez, as interações existentes entre as toxinas e os receptores, confirmando o potencial tóxico destas proteínas à *D. saccharalis*.

**Palavras-chave:** *Bacillus thuringiensis*, *Diatraea saccharalis*, proteínas Cry.

## ABSTRACT

*Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794; Lepidoptera: Crambidae) is responsible for great economic losses in crops affecting the culture and the industrial utilization of sugarcane. Their eating habits make harder the control by conventional tools causing impacts to sugarcane crops. The development of new strategies for its control is extremely important. An alternative for the control of these insects is the use of biological control agents such as *Bacillus thuringiensis* (Bt), based on the action of many different proteins synthesized by the bacteria which are active against insect orders. This study aimed to select strains from collection of Bt in Embrapa Genetic Resources and Biotechnology toxic to the sugarcane borer, *D. saccharalis*. The strains selected were characterized by biochemical and molecular methods, and the binding assays of the toxins to midgut cell receptors of *D. saccharalis* were analysed. We selected three strains of *B. thuringiensis*, named S602, S1264 and S1301, which showed activity against *D. saccharalis*. Characterization of protein profiles revealed the presence of proteins of 130 and 65 kDa, corresponding to toxins Cry1 and Cry2, respectively. The molecular characterization showed the presence of *cry1* and *cry2* genes, confirming the results shown in the protein profile. Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac and Cry2Aa proteins were expressed individually by strains of Bt. The proteins were purified, solubilized, biotinylated and activated with trypsin for performing binding assays for the observation of protein binding to the microvilli of the insect gut. The CL<sub>50</sub> of the proteins Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac and Cry2Aa showed variation between 222 and 610 ng/cm<sup>2</sup>. They have presented in the dose bioassay (LC<sub>50</sub>) Cry toxins showed no significant differences toxic results. The toxic strains selected at this work and standard showed LC<sub>50</sub> between 8 and 43 ng/cm<sup>2</sup> values inferior and significant different to the pure toxins, showed existence of synergism between toxins. The results of binding assays done with BBMV's (Brush-Border Membrane Vesicle) of *D. saccharalis*, showed for the first time, the interactions between receptors and toxins, confirming the potential toxic effects of these proteins to *D. saccharalis*.

**Key Words:** *Bacillus thuringiensis*, *Diatraea saccharalis*, Cry proteins,



## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A cana-de-açúcar é um dos principais produtos agrícolas do Brasil. Em razão do aumento do interesse econômico por esta cultura, sua produção aumentou significativamente nos últimos anos (MENOSSI *et al.*, 2008; GIANOTTO *et al.*, 2011).

Em 2009, segundo dados da *Food and Agricultural Organization* (FAO), a produção brasileira representou 33% da produção mundial. Em 2010, foram produzidos 27,6 bilhões de litros de álcool e 624 milhões de toneladas de açúcar, consolidando-se como importante agente no mercado internacional (CONAB, 2011).

O aumento da conscientização acerca dos riscos dos agrotóxicos aos seres humanos e ao ambiente requer o emprego de alternativas mais seguras no controle de pragas em geral. Assim, os agentes de controle biológico, principalmente as bactérias, são uma alternativa econômica e ecologicamente viável (PRAÇA *et al.*, 2004).

A necessidade de desenvolvimento de novas tecnologias mais eficientes no controle de insetos endofíticos que atacam a cana é de grande importância, pois a fase larval é o estágio mais extenso do ciclo de vida se tornando o principal responsável pelos danos na cultura da cana-de-açúcar. Neste contexto, o uso do *Bacillus thuringiensis* (Bt) aparece como uma estratégia promissora no mecanismo para o controle de *Diatraea saccharalis* (Fabr.1794) (Lepidoptera: Crambidae) (SCHNEPF *et al.*, 1998; PRAÇA *et al.*, 2004; GITAHY *et al.*, 2007; DALZOTO & UHRY, 2009).

*D. saccharalis* é considerada a principal praga da cultura da cana-de-açúcar no Brasil. É responsável pelas grandes perdas econômicas nas lavouras, em função do seu hábito alimentar, que se caracteriza pela penetração da lagarta nos colmos da planta, limitando seu controle por métodos convencionais (PARRA *et al.*, 2002; GITAHY *et al.*, 2007).

Atualmente, o manejo da broca-da-cana é realizado principalmente através do controle biológico, com a criação em massa e liberação do parasitóide *Cotesia flavipes*. Entretanto, o uso deste parasitóide não tem conseguido manter a população da broca-da-cana sob controle, pela dificuldade de atingir a larva dentro do colmo da cana.

A busca de estirpes de Bt eficazes contra a broca-da-cana de grande importância para o manejo desta praga uma vez que estudos sobre este assunto ainda são limitados. Uma das vantagens da utilização de *B. thuringiensis* é sua especificidade aos insetos sensíveis à ação de suas toxinas, esta bactéria não possui efeito poluente ao meio

ambiente, é inócua aos mamíferos, a outros invertebrados e às plantas (WHITELEY & SCHNEPF, 1986; MONNERAT & BRAVO, 2000; GRECCO *et al.*, 2007).

A ação tóxica desta bactéria contra insetos-praga da ordem lepidóptera apresenta grande importância para expansão da utilização do uso de produtos à base de Bt nas lavouras de cana-de-açúcar existentes no Brasil.

Este trabalho teve como objetivo selecionar e caracterizar estirpes de Bt que sejam ativas para o controle da *D. saccharalis*, e avaliar a interação das toxinas com os receptores intestinais extraídos de uma criação deste inseto estabelecida em laboratório.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 A cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) a primeira espécie botânica introduzida e cultivada há quatro séculos no litoral do Nordeste, apresentou importância histórica e econômica na formação do Brasil. É originária da Ásia Meridional, pertence à família das gramíneas e é cultivada em países tropicais e subtropicais (SCHUCH, 2007).

O Brasil é considerado o maior produtor mundial de cana-de-açúcar. A cultura canavieira contribui significativamente com a economia brasileira, e continua em expansão no Brasil. Sua ocupação no território brasileiro destinada à atividade sucroalcooleira ocupa, aproximadamente, de 2% de toda a terra arável (UNICA, 2012). Esta cultura está presente em todas as regiões do país, e está concentrada na região Sudeste, que é responsável por aproximadamente 70% da produção nacional de cana.

O Estado de São Paulo representa 54,23% (4.357,01 mil hectares) da área plantada, e é considerado o maior produtor brasileiro de cana-de-açúcar, seguido de Minas Gerais com 8,1% (649,94 mil hectares) e do Paraná com 7,25% (582,32 mil hectares). A área de cana-de-açúcar colhida no Brasil foi estimada em oito mil hectares, distribuídas em todos estados produtores (CONAB, 2011).

Sua importância econômica é atribuída à grande diversidade de sua utilização. É a principal matéria-prima para a indústria sucroalcooleira, podendo ser utilizada *in natura*, sob forma de forragem, para alimentação animal, ou como matéria-prima para a produção de açúcar, álcool, bioetanol, biodiesel, produtos farmacêuticos, aguardente e é uma fonte renovável de energia (CONAB, 2009).

### 2.2 *Diatraea saccharalis* (Broca-da-cana)

Existem catalogados mais de 1.500 espécies de insetos que utilizam a cana-de-açúcar como fonte de alimento (PINTO, 2006). Deste total, larvas de mais de 50 espécies de lepidópteros são descritas como praga desta cultura. Dentre estas, as principais são a broca-gigante (*Telchin licus licus*), a broca-da-cana (*Diatraea saccharalis*), e a *Diatraea flavipennela* (LONG & HENSLEY, 1972; GITAHY *et al.*, 2007).

*Diatraea saccharalis* (Figura 1), é considerada a principal e mais conhecida praga da indústria canavieira. O primeiro relato de ocorrência dessa praga no Brasil foi em 1841 em canaviais de Santa Catarina (GUAGLIUMI, 1973). Além da cana-de-açúcar, a broca-da-cana, ataca outras gramíneas, como o arroz, aveia, cevada, milheto, milho, sorgo e trigo (LONG & HENSLEY, 1972).

A broca-da-cana, *D. saccharalis*, é um inseto da ordem Lepidoptera, da família Crambidae e sub-família Crambinae (LANGE *et al.*, 2004). Este inseto apresenta desenvolvimento holometabólico, ou seja, passa pelas fases de ovo, larva, pupa e adulto. A duração do seu ciclo biológico depende principalmente da temperatura e fatores climáticos. Podem ocorrer até cinco gerações anuais. A fase larval é a mais longa, podendo variar de 50 a 90 dias, o período em fase de pupa de 10 a 11 dias e a longevidade do adulto dura em média de três a sete dias (PARRA *et al.*, 2002).

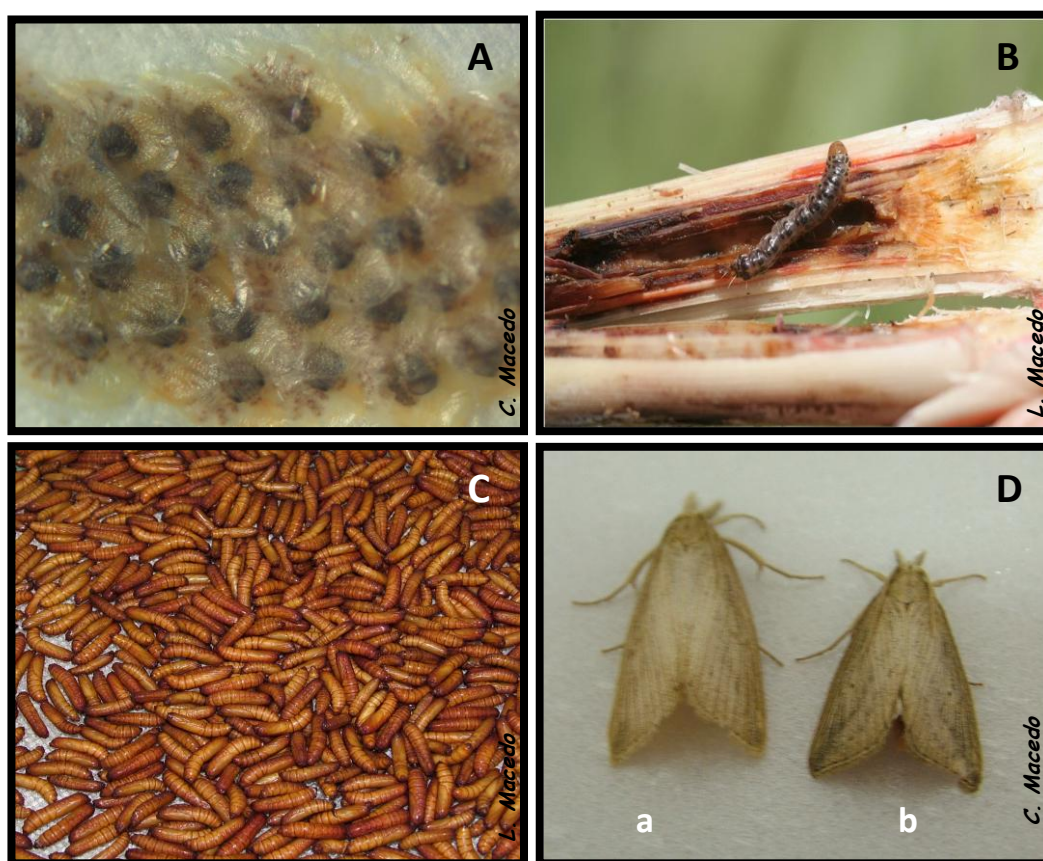


Figura 1 – Fases de desenvolvimento de *D. saccharalis*. A, ovos; B, Lagarta de quarto ínstar; C, Pupa; D, inseto a) fêmea; b) macho.

Os danos provocados pela broca-da-cana são observados desde os primeiros dias de vida deste inseto, logo após a eclosão da larva. A larva ainda no primeiro estágio se alimenta dos tecidos da planta e tem o comportamento de penetração para o interior dos colmos, ocasionando danos caracterizados como danos diretos e indiretos, que podem ocorrer isolados ou associados (GALLO *et al.*, 2002).

Os danos diretos são caracterizados por aberturas de galerias, falhas na germinação, morte da gema apical, tombamento dos colmos, perda do tecido, enraizamento aéreo e germinação das gemas laterais. Os danos indiretos estão relacionados com a entrada de microrganismos oportunistas, principalmente fungos (*Fusarium moniliforme* e/ou *Colletotrichum falcatum*) responsáveis pela podridão vermelha, que provoca sérias perdas industriais, pela inversão da sacarose e diminuição da pureza do caldo, levando a um menor rendimento de açúcar e contaminações da fermentação alcoólica, provocando menor rendimento do álcool (LONG & HENSLEY, 1972; MACEDO & BOTELHO, 1988; GALLO *et al.*, 2002; CRUZ *et al.*, 2007).

Devido aos prejuízos causados às culturas, cada vez mais inseticidas são utilizados para o controle de insetos. O uso abusivo e impróprio de agrotóxicos vem causando danos ao ser humano e ao meio ambiente, atingindo inimigos naturais, contaminando alimentos, solo, água e favorecendo uma rápida seleção de insetos resistentes. O enfoque conservacionista vem ganhando grande destaque com a crescente preocupação em diminuir os impactos ambientais causados pela ação humana, o que abre perspectivas para a utilização do controle biológico no manejo de insetos na cultura da cana-de-açúcar (BOTELHO, 1995).

A metodologia mais utilizada no monitoramento do dano é a determinação do percentual de perdas para cada 1% de intensidade de infestação da broca. Resultados de diversos autores mostram que para cada 1% de intensidade de infestação da praga, ocorrem prejuízos de 0,25% de açúcar, 0,20% de álcool e 0,77% de peso. Armadilhas luminosas, mostrando preferência pela luz verde, e armadilhas com feromônio sexual são utilizadas como alternativa de monitoramento (MENDES *et al.*, 1976; LYRA *et al.*, 1990; LIMA FILHO & LIMA, 2001; GALLO *et al.*, 2002; CAMPOS & MACEDO, 2004).

O controle cultural é baseado no corte da cana, moagem rápida, e eliminação das plantas hospedeiras nas proximidades do canavial, principalmente milho e milheto, após a colheita da cana (GALLO *et al.*, 2002).

O controle químico é inadequado devido à dificuldade de penetração, no alcance limitado para atingir a lagarta e também no comprometimento ambiental pelos casos de resistência aos pesticidas. Existem relatos na literatura de populações de *D. saccharalis* resistentes aos inseticidas: azinfós-metil, carbofurano, endossulfan, endrim, monocrotofós e tebufenozide nos Estados Unidos (REAY-JONES *et al.*, 2005; GITAHY *et al.*, 2007; PESTICIDE RESISTANCE, 2011).

O primeiro parasitóide utilizado no controle biológico aplicado à broca foi a mosca cubana, *Lixophaga diatraea* (Diptera: Tachinidae), introduzida nos Estados Unidos em 1915. Em 1950 essa mosca foi introduzida no Brasil, no Estado de São Paulo e em 1973 levada aos canaviais da região Nordeste. Entretanto, esse parasitóide apresentou controle limitado (PLANALSUCAR, 1973).

Atualmente, o controle biológico feito pelo parasitóide larval *Cotesia flavipes* é o método mais utilizado para o manejo da broca-da-cana em nosso país e no mundo (PINTO *et al.*, 2006).

A broca-da-cana-de-açúcar é atacada por diversos inimigos naturais, proporcionando o emprego de técnicas de manejo integrado de pragas (MIP) utilizando produtos químicos e parasitóides, multiplicados em laboratório e liberados no campo. Um outro inimigo natural muito utilizado no MIP é o *Trichogramma galloi*, responsável por atacar os ovos de lepidópteros (BOTELHO *et al.*, 1995).

Grecco *et al.*, (2007), selecionaram isolados de *Bacillus thuringiensis*, tóxicos à broca-da-cana e constataram que são os mais indicados para o controle desta praga pela sua eficiência e especificidade aos indivíduos desta espécie.

## **2.3 *Bacillus thuringiensis***

### **2.3.1 Características gerais**

*Bacillus thuringiensis* é uma bactéria do solo, Gram positiva, aeróbia, da família Bacillaceae que produz no momento de sua esporulação inclusões protéicas cristalinas. As inclusões protéicas são compostas por proteínas, conhecidas como  $\delta$ -endotoxinas ou proteínas Cry, que são altamente tóxicas a uma ampla variedade de insetos-praga de importância econômica, como também outros invertebrados (ARANDA *et al.*, 1996; MONNERAT & BRAVO, 2000).

Esta espécie caracteriza-se pela produção de toxinas, provocando a morte de larvas de insetos-praga e vetores de doenças, sendo inócuos a outros organismos, como seres humanos, invertebrados e plantas (WHITELEY & SCHNEPF, 1986; OMS, 1987; SARAIVA *et al.*, 2007).

O primeiro trabalho relatando doenças em insetos causadas por este tipo de bactéria data de 1902, quando Ishiwata no Japão descreveu uma bactéria esporulante responsável pela mortalidade do bicho-da-seda, *Bombix mori* e a chamou de *Bacillus sotto*. Em 1911, Berliner descreveu novamente a mesma bactéria isolada a partir de lagartas da traça da farinha *Anagasta kuhniella* e em 1915, a chamou de *B. thuringiensis*, em homenagem a região de onde as lagartas foram coletadas (WHITELEY & SCHNEPF, 1986).

As possibilidades de utilização do *B. thuringiensis* foram logo reconhecidas em controle biológico, e em 1938 uma formulação a base desta bactéria, a Sporeína foi produzida na França. A partir dos anos 1950, diversos países como a Rússia, a Checoslováquia, a França, a Alemanha e Estados Unidos começaram a produzir inseticidas biológicos à base de *B. thuringiensis* (WEISER, 1986).

As estirpes de *B. thuringiensis* são agrupadas taxonomicamente por sorotipos ou subespécies, baseada em propriedades bioquímicas, na reação de aglutinação de antígenos flagelares das células vegetativas, presentes nas primeiras horas de crescimento da bactéria. Esta classificação baseia-se num método proposto por De Barjac & Bonnefoi (1962), que divide a espécie de *B. thuringiensis* em 82 subespécies, facilitando a diferenciação entre as várias estirpes.

Uma grande quantidade de estirpes de Bt foi isolada e caracterizada, envolvendo vários grupos de pesquisa, em todo o mundo, em busca de novas toxinas (FEITELSON *et al.*, 1992). Atualmente, estima-se que haja mais de 50.000 estirpes conhecidas em todo o mundo, incluindo estirpes tóxicas a insetos das ordens Lepidoptera, Diptera, Coleoptera e além de ácaros e nematóides; (MELO & AZEVEDO, 1998).

### **2.3.2 Toxinas produzidas pelo *B. thuringiensis***

As toxinas Cry ou  $\delta$ -endotoxinas, também conhecidas como proteínas Cry e Cyt, são toxinas produzidas por estirpes de Bt. As proteínas caracterizadas como toxinas formadoras de poros Cry formam inclusões parasporais que são tóxicas a um organismo alvo. Atualmente, 500 sequências de genes *cry* diferentes foram descritos em 70 grupos

organizados em diferentes subgrupos, e as sequências de aminoácidos classificados (Cry1 e Cry70). A atualização destes dados pode ser visualizada via internet no endereço <http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/NeilCrickmore/Bt/vip.html>. (CRICKMORE *et al.*, 2010).

A grande variabilidade de toxinas Cry conhecidas atualmente permite compreender elementos importantes na função da toxina e sua especificidade ao inseto (PIGOTT & ELLAR *et al.* 2007). Várias estirpes de *B. thuringiensis* têm sido isoladas em todo o mundo, sendo altamente específicas para os insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera (SOUZA *et al.*, 1999).

A maioria das estirpes de *B. thuringiensis* pode sintetizar mais de um tipo de cristal. Os cristais podem ser formados por diferentes proteínas Cry, podendo haver casos em que cinco toxinas são encontradas, como por exemplo, no *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*. A massa molecular dessas toxinas pode variar entre 14 e 142 kDa. Dependendo da composição da protoxina, o cristal pode ser bipiramidal, cubóide, rombóide, ovóide, esférico, retangular ou, ainda, sem forma definida. Essa habilidade de cristalização das protoxinas pode diminuir sua suscetibilidade à degradação por proteases do hospedeiro (SCHNEPF *et al.*, 1998).

Além das proteínas Cry, *B. thuringiensis* pode produzir várias outras toxinas, incluindo proteínas com atividade inseticida como a  $\alpha$ -exotoxina,  $\beta$ -exotoxina, hemolisinas, enterotoxinas, quitinases e fosfolipases.

A  $\alpha$ -exotoxina, também conhecida como fosfolipase C, lecitinase ou fosfatidilcolina fosfohidrolase, é uma enzima que possui atividade citolítica ao atuar sobre os fosfolipídios que formam as membranas celulares de diversas células (FAUST & BULLA, 1982). Esta toxina é termolábil, solúvel em água e altamente tóxica a alguns insetos quando administrada via oral ou intra-hemocélica. Nesse caso, essa proteína pode causar degeneração e lise de hemócitos (KRIEG, 1971; HANSEN & SALAMITOU, 2000). Além disso, a toxina também pode apresentar toxicidade a ratos e outros vertebrados (LECHNER *et al.*, 1989).

As  $\beta$ -exotoxinas, também conhecidas como Thuringiensinas, são toxinas termoestáveis produzidas por algumas estirpes de Bt. Existem dois tipos de  $\beta$ -exotoxinas. A toxina do tipo I é um análogo do ATP composta de adenina, ribose, glicose e ácido fosfoalárico, com massa molecular de 701 D (FARKAS *et al.*, 1969). É altamente tóxica para várias ordens de insetos, ácaros, nematóides e vertebrados, com efeitos mutagênicos e teratogênicos (HANSEN & SALAMITOU, 2000). A toxina do



tipo II é um análogo de UTP e apresenta toxicidade superior à do tipo I, principalmente em coleópteros (LEVINSON *et al.*, 1990). Devido à toxicidade a vertebrados, desde de 1970, os produtos comerciais baseados em Bt produtores desta toxina foram substituídos por outros não produtores de  $\beta$ -exotoxina (SEBESTA *et al.*, 1981).

As proteínas “Vip” (*Vegetative Insecticidal Proteins*) são produzidas em etapas iniciais do processo de crescimento das bactérias em cultura (ESTRUCH *et al.*, 1996). Até o momento, foram descritos quatro grupos de proteínas Vip (Vip1, Vip2, Vip3, e Vip4). As proteínas Vip foram excluídas da nomenclatura Cry por não possuírem homologia com a sequência ou estruturas das  $\delta$ -endotoxinas. A toxina Vip1-Vip2 tem atividade específica contra coleópteros e hemípteros, enquanto a toxina VIP3 possuem especificidade à lepidópteros (ESTRUCH *et al.*, 1996.; WARREN, 1997; SATTAR *et al.*, 2008). Tem sido muito utilizada para criar plantas transgênicas com resistência contra alguns importantes insetos-praga. VIP3A age sobre insetos suscetíveis pela interação com receptores específicos da membrana presentes nas células epiteliais do intestino causando a lise do tecido epitelial (YU *et al.*, 1997, 2011).

### **2.3.3 Modo de ação**

Atualmente, existem vários modos de ação já descritos. Porém, o modo de ação mais aceito atualmente foi descrito por Bravo *et al.*, (2007). O mecanismo de ação envolve vários passos (Fig. 2): solubilização do cristal, processamento das toxinas, interações específicas com vários receptores, união ao receptor e inserção de uma parte da toxina na membrana apical das células intestinais dos insetos, formando o poro que leva o inseto à morte

Os receptores responsáveis pela ligação da toxina à membrana tem sido extensivamente estudados em lepidópteros para determinar especificidade, toxicidade e mecanismo de ação das toxinas Cry (GÓMEZ *et al.*, 2006; BRAVO *et al.*, 2007; ARENAS *et al.*, 2010). A união aos sítios receptores é uma etapa determinante da especificidade das toxinas Cry, o que motivou diversos grupos de pesquisa a se dedicarem ao entendimento desse processo (MONNERAT & BRAVO, 2000).

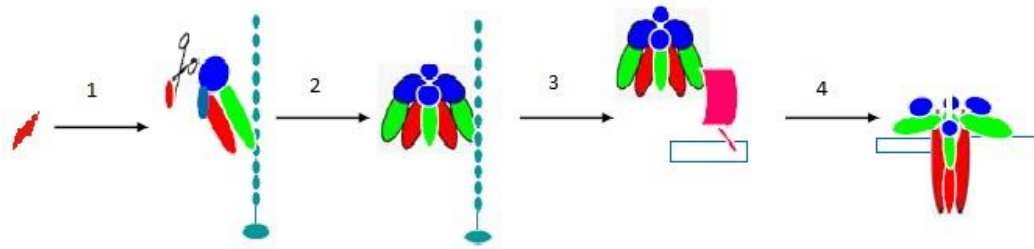


Figura 2. Modo de ação das toxinas Cry1A para lepidóptero descrito por Bravo *et al.*, (2007). Modelo do modo de ação das toxinas Cry e Cyt. Interação sequencial das toxinas Cry com diferentes receptores moleculares em larvas de lepidópteros. (1) Solubilização e ativação da toxina; (2) Ligação da toxina monomérica ao primeiro receptor (Caderina ou CADR), uma mudança conformacional da toxina e ocorre a clivagem da hélice  $\alpha$ -1; (3) Ligação da toxina oligomérica ao segundo receptor (GPI-APN ou GPI-ALP) e mudança conformacional da proteína; (4) Inserção da estrutura oligomérica na membrana e formação do poro.

Muitos receptores de toxina Cry presentes na superfície do intestino médio tem sido relatados, dos quais o melhor caracterizado são os receptores aminopeptidase N (APN ou ALP) e os receptores caderina (CADR) (PIGOTT & ELLAR, 2007). Estudos recentes revelaram que a caderina desempenha um papel fundamental sobre o modo de ação de toxinas Cry1A em lepidópteros, sendo esta o primeiro receptor da toxina Cry, que tem a função de direcionar a ligação para um segundo receptor que pode ser uma aminopeptidase ou fosfatase-alcálico. Esta ligação na membrana confere que proteínas de membrana específicas sejam formadas, resultando na inserção de oligômeros, formação do poro e morte da célula por choque osmótico (BRAVO *et al.*, 2004; PIGOTT & ELLAR, 2007; PENG *et al.*, 2010).

Os cristais de *B. thuringiensis*, após serem ingeridos pelas larvas dos insetos suscetíveis, sofrem ação do pH intestinal e de proteases que os solubiliza e ativa as toxinas, liberando uma ou mais toxinas Cry. O intestino médio da maioria do insetos-

alvo apresenta pH elevado, em torno de 9,5, promovendo a dissolução da maioria das protoxinas de *B. thuringiensis*.

As protoxinas para serem ativadas necessitam ser processadas pelas proteases intestinais contidas no suco gástrico das larvas, liberando os fragmentos tóxicos. Estes, por sua vez, se ligam a receptores específicos localizados no tecido epitelial do intestino da larva, ocasionando a quebra do equilíbrio osmótico das células, levando à formação do poro na superfície da membrana. As células se intumescem e se rompem, propiciando o extravasamento do conteúdo intestinal para hemocele do inseto.

Os sintomas que são observados nas larvas a partir desse momento são: perda do apetite, paralisia do intestino, vômito, diarreia, paralisia geral e por fim morte do inseto. Não há atividade de *B. thuringiensis* nas fases de pupa e de adulta dos insetos (ARONSON *et al.*, 1986; MONNERAT & BRAVO, 2000).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

O objetivo deste trabalho foi identificar e caracterizar estirpes de *B. thuringiensis* tóxicas a *Diatraea saccharalis*.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Desenvolver um protocolo de bioensaio seletivo e de dose contra a broca-da-cana;
- Selecionar estirpes de *Bacillus thuringiensis* eficazes no controle da *D. saccharalis*.
- Avaliar a toxicidade de proteínas de *Bacillus thuringiensis* contra a broca-da-cana;
- Caracterizar as estirpes selecionadas por meio de perfil bioquímicos e moleculares estirpes de *B. thuringiensis* tóxicas a *Diatraea saccharalis*;
- Avaliar da interação das toxinas com os receptores de membrana intestinal do inseto - BBMV's ("Brush Border Membrane Vesicles") de *D. saccharalis*.

#### 4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARANDA, E.; SANCHEZ, J.; PERFEROEN, M.; GÜERECA, L.; BRAVO, A. Interactions of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins with the midgut epithelial cells of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 68, p. 203-212, 1996.

ARENAS, I.; BRAVO, A.; SOBERÓN, M.; GÓMEZ, I. Role of alkaline phosphatase from *Manduca sexta* in the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab Toxin. **Journal of Biological Chemistry**. v. 23, n. 285(17), p. 12497–12503, 2010.

ARONSON, A. I.; BECKMAN, W.; DUNN, P. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. **Microbiology Review**. v. 50, p. 1-24, 1986.

BOTELHO, P.S.M.; PARRA, J.R.P.; MAGRINI, E.A.; HADDAD, M.L.; RESENDE, L.C.L. Efeito do número de liberações de *Trichogramma galloi* (Zucchi, 1988) no parasitismo de ovos de *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794). **Scientia Agricola**, Piracicaba, 52(1): 65-69, 1995.

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

BRAVO, A.; GÓMEZ, I.; CONDE, J.; MUÑOZ-GARAY, C.; SÁNCHEZ, J.; MIRANDA, R.; ZHUANG, M.; GILL, S.S.; SOBERÓN, M. Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. **Biochemistry et Biophysical Acta**. v. 1667, p. 38–46, 2004.

CAMPOS, M. B. S.; & MACEDO, N. Cana-de-açúcar - ampliando campo de ataque. **Cultivar: Grandes Culturas**, v. 6, n. 68, p. 23-26, 2004.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB – Menu do agronegócio. Safras: Cana. Terceiro Levantamento, dezembro de 2009. Disponível em: [http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/1cana\\_de\\_acucar.pdf](http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/1cana_de_acucar.pdf)>. Acesso em: 02 fev., 2010.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-açúcar, terceiro levantamento - Companhia Nacional de Abastecimento**. Brasília, 2011.

CRICKMORE, N., ZEIGLER, D.R., SCHNEPF, E., VAN RIE, J., LERECLUS, D., BAUM, J., BRAVO, A., DEAN, D.H., *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. [http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil\\_Crickmore/Bt/index.html](http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/index.html), 2010.

CRUZ, I. A Broca da Cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis*, em Milho, no Brasil. **Circular técnica, 90**. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento. EMBRAPA. v. 12 p. 1679-1150, 2007.

DALZOTO, P.R. & UHRY, K.F. Controle biológico de pragas no Brasil por meio de *Beauveria bassiana* (bals.) vuill. **Biológico. Divulgação Técnica**. São Paulo, v. 71, n.1, p. 37-41, 2009.

DE BARJAC, H.; BONNEFOI, A. Essai de classification biochimique et serologique de 24 souches de *Bacillus* du type *Bacillus thuringiensis*. **Entomophaga**, v. 7, p. 5-31, 1962.

ESTRUCH, J.J.; WARREN, G.W.; MULLINS, M.A.; NYE, G.J.; CRAIG, J.A. & KOZIEL. M.G. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, p. 5389–5394, 1996.

FARKAS, J., SEBESTA, K., HORSKA, K., SAMEK, Z., DOLIJS, J. AND SORM, F. The structure of exotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. gelechiae. **Collection of Czechoslovak Chemical Communications**, v. 34, p. 1118-1120, 1969.

FAUST, R.M. & BULLA, L.A. Bacteria and their toxins as insecticides. In: E. Kurstak (ed). **Microbial and viral pesticides**, p. 75-208, 1982.

FEITELSON, J. S. PAYNE, J. AND KIM, L. *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. **Biotechnology**, v. 10, p. 271-275. 1992.

FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION. [S.I.], 2009. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/default.aspx>>. Acesso em: 10 janeiro 2011.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BAPTISTA, C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIM, D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 920 p., 2002.

GITAHY, P. M., SOUZA, M. T., MONNERAT, R.G., ARRIGONI, E.B., BALDANI, J.I. A Brazilian *Bacillus thuringiensis* strain highly active to sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE). **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 38, p. 531-537, 2007.

GIANOTTO, A.C.; ABREU, H. M. C.; ARRUDA, P.; BESPALHOK FILHO, J. C.; BURNQUIST, W. L.; CRESTE, S.; DI CIERO, L.; FERRO, J. A.; FIGUEIRA, A.V. O.; FILGUEIRAS, T. S. ;GROSSI-DE-SÁ, M. F.; GUZZO, E. C.; HOFFMANN, H. P.; LANDELL, M. G. A.; MACEDO, N.; MATSUOKA, S.; REINACH, F. C.; ROMANO, E.; SILVA; W. J.; SILVA FILHO, M. C.; ULIAN, E. C. Sugarcane (*Saccharum X officinarum*): A Reference Study for the Regulation of Genetically Modified Cultivars in Brazil. **Tropical Plant Biology**, v. 4, p. 62–89, 2011.

GÓMEZ, I.; ARENAS, I.; BENITEZ, I.; MIRANDA-RÍOS, J.; BECERRIL, B.; GRANDE, R.; ALMAGRO, J. C.; BRAVO, A.; SOBERÓN, M. Specific epitopes of Domains II and III of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin involved in the Sequential Interaction with Cadherin and Aminopeptidase-N Receptors in *Manduca sexta*. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 281, n. 45, p. 34032–34039, 2006.

GRECCO, E.D.; MACHADO, F.S.; FRACALOSSIL, A.M.; MINAS, R.S.; POLANCZYK, R.A.; PRATISSOLIL, D. **Avaliação de patogenicidade de *Bacillus thuringiensis* (BERLINER) para *Diatraea saccharalis* (LEP.: CRAMBIDAE).** IX Encontro Latino Americano de Iniciação Científica, V Encontro Latino Americano de pós-graduação – Universidade do Vale do Paraíba, p. 650-652, 2007.

HANSEN, B.M. & SALAMITOU, S. Virulence of *Bacillus thuringiensis* In: CHARLES, J.F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LE ROUX, C. (Ed.). **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application.** Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 41-64, 2000.

KRIEG, A. Is the potencial pathogenicity of bacilli for insects related to production of alpha-exotoxin. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 18, p. 425-426, 1971.

LANGE, C.L., SCOTT, K.D., GRAHAM, G.C., SALLAM, M.N., ALLSOPP, P.G. Sugarcane moth borers (Lepidoptera: Noctuidae and Pyraloidea): phylogenetics constructed using COII and 16S mitochondrial partial gene sequences. **Bull. Entomological Research.**, v. 94, p. 457-64, 2004.

LECHNER, M.; KUPKE, T. STEFANOVIC, S.; GÖTZ, F. Molecular characterization and sequence of phosphatidylinositol-specific phospholipase C of *Bacillus thuringiensis*. **Molecular Microbiology**. v. 3 p. 621-626, 1989.

LIMA FILHO, M. & LIMA, J.O.G. Massa de ovos de *Diatraea saccharalis* (Fabr.) (Lepidoptera: Pyralidae) em cana-de-açúcar: número de ovos e porcentagem de parasitismo por *Trichogramma* spp. (Hymenoptera: Trichogrammatidae) em condições de campo. **Neotropical Entomology**. v. 30, n. 3, p. 483-487, 2001.

LONG, W. H.; HENSLEY, S. D. Insect pests of sugar cane. **Annual Review Entomology**, USA, p. 149 -176, 1972.

LYRA NETTO, A.M.C. de; LIRA, M.A.; FRANÇA, J.G.E. de; MACIEL, G.A.; FREITAS, E.V. Flutuação populacional de *Diatraea* spp. (Lepidoptera: Pyralidae) em



sorgo com armadilha luminosa. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 19, n. 2, p. 355-360, 1990.

MACEDO, N.; BOTELHO, P. S. M. Controle integrado da broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera, Pyralidae). **Brasil Açucareiro**, Rio de Janeiro, v. 106, n. 2, p. 2-14, 1988.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. de. **Controle biológico**. Jaguariúna : Embrapa-CNPMA, 264 p., 1998.

MENDES, A.C.; BOTELHO, P.S.M.; SILVEIRA NETO, S.; MACEDO, N. **Seleção de luzes de diferentes comprimentos de onda para atração da broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794) (Lepidoptera-Crambidae)**. Brasil Açucareiro, Rio de Janeiro, n. 2, p. 139-145, 1976.

MENOSSE, M., SILVA-FILHO M. C., VINCENTZ, M., VAN-SLUYS, M.-A., SOUZA, G.M. Sugarcane Functional Genomics: Gene Discovery for Agronomic Trait Development. Hindawi Publishing Corporation. **International Journal of Plant Genomics**. Review Article. Article ID 458732, 11 p., 2008.

MONNERAT, R. G.; BRAVO, A. **Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência**. In: Controle Biológico, eds. Melo, I.S. e Azevedo, J.L, Jaguariúna, SP, Embrapa Meio Ambiente. v. 3, p. 163-200, 2000.

ORGANISATION MONDIAL DE LA SANTE (OMS). Report of an Informal Consultation on the Detection, Isolation, Identification and Ecology of Biocontrol Agents of Disease Vectors. UNDP/WORLD BANK/WHO Special **Programme for Research and Training in tropical Diseases**, TDR/BCV/IC-GE/87.3, 41 p., 1987.

PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.M.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; BENTO, J.M. **Controle biológico no Brasil**. São Paulo: Manole, 609 p., 2002.

PENG, D.; XU, X.; RUAN, L. YU, Z. SUN, M. Enhancing Cry1Ac toxicity by expression of the *Helicoverpa armigera* cadherin fragment in *Bacillus thuringiensis*. **Research in Microbiology**, v. 161, p. 383-389, 2010.

PESTICIDE RESISTANCE. Database of Arthropods Resistant to Pesticides. Resistant Species Profile: *Diatraea saccharalis*. Disponível em: [http://www.pesticideresistance.org/DB/species\\_profile.php?arthropodid=399](http://www.pesticideresistance.org/DB/species_profile.php?arthropodid=399). Acesso em: 03 out. 2011.

PIGOTT, C. R. & ELLAR D. J. Role of Receptors in *Bacillus thuringiensis* Crystal Toxin Activity. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 71, n. 2, p. 255–281, 2007.

PINTO, A. S., O controle biológico de pragas da cana-de-açúcar. In Controle de Pragas da Cana-de-Açúcar. **Boletim Técnico Biocontrol**, PINTO, A. S. Ed. Biocontrol: Sertãozinho, v. 1, p. 09-13. 2006.

PINTO, A. S.; GARCIA, J. F.; OLIVEIRA, H. N., Manejo das principais pragas da cana-de-açúcar. In **Atualização em produção de cana-de-açúcar**, SEGATO, S. V.; PINTO, A. S.; JENDIROBA, E.; NÓBREGA, J. C. M., Eds. CP 2: Piracicaba, p. 257-280, 2006.

PLANALSUCAR. Novo lote de parasitos para Alagoas. **Brasil Açucareiro**, Rio de Janeiro, v. 82, n. 6, 11 p., 1973.

PRAÇA, L. B.; BATISTA, A. C.; MARTINS, É. S.; SIQUEIRA, C. B.; DIAS, D. G. S.; GOMES, A. C. M. M.; FALCÃO, R.; MONNERAT, R. G. Estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Díptera. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, p. 11-16, 2004.

PRAÇA, L. B.; SILVA, C. M. B.; ALVES, R. S. De A. Controle biológico de vetoras de doenças tropicais utilizando *Bacillus* entomopatogênicos. In: **Controle Biológico**, Eds. Melo I.S, Azevedo, J.L., Jaguariúna, SP, Embrapa Meio Ambiente, v. 2, p. 17-90, 2004.

REAY-JONES, F.P.F.; AKBAR, W.; McALLISTER, C.D.; REAGAN, T.E.; OTTEA, J.A. Reduced susceptibility to tebufenozide in populations of the sugarcane borer (Lepidoptera: Crambidae) in Louisiana. **Journal of Economic Entomology**, v. 98, n. 3, p. 955-960, 2005.

SATTAR, S.; BISWAS, P.K.; HOSSAIN, M.A.; MAITI, M.K.; SEN, S.K. & BASU, A. Search for vegetative insecticidal proteins (VIPs) from local isolates of *Bacillus thuringiensis* effective against lepidopteran and homopteran insect pests. **Journal Biopestic.**, v. 4, p. 216–222, 2008.

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

SCHUCH, H. Subcomissão da cana-de-açúcar, do álcool e do etanol - 2007. Disponível em: [http://www.al.rs.gov.br/download/Subcana\\_alcool\\_etanol/Relcana\\_alcool.pdf](http://www.al.rs.gov.br/download/Subcana_alcool_etanol/Relcana_alcool.pdf)>. Acesso em: 15 fev. 2012.

SEBESTA, K.; FARKAS, J.; HORSKA, K.; VANKOVÁ. Thuringiensin, the beta-exotoxin of *Bacillus thuringiensis*. In Burgess H. D. (ed.), Microbial control of pests and plant disease 1970-1980. **Academic Press**, p. 249-277. 1981.

SOUZA, M.T. de; LIMA, M.I.; SILVA-WERNECK, J.O.; DIAS, J.C.S.; RIBEIRO, B.M. Ultrastructural and molecular characterization of the parasporal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* S93 active against *Spodoptera frugiperda*. **Biocell**, v. 23, p. 43-49, 1999.

ÚNICA - União da indústria da cana-de-açúcar. Setor Sucroenergético. Disponível em: <http://www.unica.com.br/content/show.asp?cntCode=9E97665F-3A81-46F2-BF69-26E00C323988>. Acesso em: 11 fev. 2012.

WARREN, G.W. **Vegetative insecticidal proteins: novel proteins for control of corn pests.** In: Carozzi NB, Koziel M (eds) **Advances in insect control, the role of transgenic plants.** Taylors & Francis Ltd., p. 109–121. 1997.

WEISER J. Impact of *Bacillus thuringiensis* on applied entomology in eastern Europe and in Soviet Union. In: Krieg A., Huger A. M., **Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem Heft**, v. 233, p. 37-50, 1986.

WHITELEY H. R., SCHNEPF H. E., The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Microbiology**, v. 40, p. 549-576, 1986.

Capítulo único

**SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ESTIRPES  
DE *Bacillus thuringiensis* EFETIVAS CONTRA  
*Diatraea saccharalis* (FABR. 1794) (LEPIDOPTERA:  
CRAMBIDAE)**

## RESUMO

Este trabalho teve como objetivo selecionar e caracterizar por meio de métodos bioquímicos e moleculares estirpes de *B. thuringiensis* tóxicas a *D. saccharalis*. Além disso, foram conduzidos experimentos para verificação da ligação das toxinas aos receptores de membrana presentes no intestino médio das larvas deste inseto. Foi utilizada larvas de segundo ínstar de *D. saccharalis* para determinação da atividade tóxica. Bioensaios seletivos foram realizados com 106 estirpes pertencentes à coleção de Bactérias de Invertebrados da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia com potencial tóxico à broca-da-cana. Delas, 16 causaram mortalidade de 100%, e pertenciam aos sorotipos *kurstaki* (S1258, S1264, S2193 e S2195), *tolworthi* (S1303 e S1304), *aizawai* (S1295), *galleriae* (S1298) e *morrisoni* (S1301) descritos na literatura como tóxicos a Lepidoptera. As estirpes S602, S1264 e S1301 causaram mortalidade em 24 h, superior a 75% no bioensaio com a cultura diluída em 50 vezes. Testes moleculares foram realizados com todas as estirpes que apresentaram toxicidade, os resultados dos testes detectaram a presença dos genes *cry1* e *cry2*, principalmente os genes do tipo *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac* e *cry2Aa*. A caracterização do perfil protéico revelou a presença de proteínas de 130 e 65 kDa, que correspondem às toxinas Cry1 e Cry2, respectivamente. Quatro estirpes recombinantes (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa) foram utilizadas neste trabalho para determinar a dose letal necessária para causar mortalidade em 50% da população (CL<sub>50</sub>) de larvas de *D. saccharalis*. A CL<sub>50</sub> das proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa variou entre 222 e 610 ng/cm<sup>2</sup>. Todas as proteínas apresentaram resultados de toxicidade significativamente semelhantes, pois os valores do intervalo de confiança se sobrepõem. As estirpes tóxicas selecionadas nesse trabalho e o padrão apresentaram CL<sub>50</sub> de 8 a 43 ng/cm<sup>2</sup> bastante inferior e significativamente diferente do das toxinas puras, indicando haver sinergismo entre as toxinas. Os resultados dos ensaios de ligação realizados com os possíveis receptores de membrana intestinais mostraram, pela primeira vez, as interações existentes entre as toxinas e os receptores, confirmando o potencial tóxico destas proteínas à *D. saccharalis*.

Palavras-chave: *Bacillus thuringiensis*, *Diatraea saccharalis*, proteínas Cry,

## ABSTRACT

This work aimed to select and characterize through bioassays and biochemical and molecular methods, strains of *B. thuringiensis* which are toxic for *D. saccharalis*. Additionally, experiments to verify binding of these proteins to membrane cell receptors of *D. saccharalis* larvae were conducted. There were utilized second development stage larvae of *D. saccharalis* for determination of toxic activity. Selective bioassays were carried with 106 strains. Sixteen, of them caused 100% of mortality belonging to serotypes *kurstaki* (S1258, S1264, S2193 e S2195), *tolworthi* (S1303 e S1304), *aizawai* (S1295), *galleriae* (S1298) and *morrissoni* (S1301) described as toxic against Lepidoptera insect. The strains S602, S1264 and S1301 caused mortality in 24 hours, more than 75% at bioassays with diluted culture 50 times. Molecular test were carried with all the strains that showed toxicity, the detected results showed the presence of genes *cry1* and *cry2*, most of them the genes *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac* e *cry2Aa*. Recombinants strains (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa) were utilized at this work to determinate letal dose to cause 50% of this population mortality of larvae *D. saccharalis*. The CL<sub>50</sub> of the proteins Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac and Cry2Aa showed variation between 222 and 610 ng/cm<sup>2</sup>. They have presented in the dose bioassay (LC<sub>50</sub>) Cry toxins showed no significant differences toxic results. The toxic strains selected at this work and standard showed LC<sub>50</sub> between 8 and 43 ng/cm<sup>2</sup> values inferior and significant different to the pure toxins, showed existence of synergism between toxins. The results of binding assays done with BBMV's (Brush-Border Membrane Vesicle) of *D. saccharalis*, showed for the first time, the interactions between receptors and toxins, confirming the potential toxic effects of these proteins to *D. saccharalis*.

**Key Words:** *Bacillus thuringiensis*, *Diatraea saccharalis*, proteins Cry,

## 1. INTRODUÇÃO

A expansão da produção da cana-de-açúcar expõe esta cultura ao ataque de diversas pragas. *Diatraea saccharalis*, conhecida como broca-da-cana-de-açúcar, é uma praga polífaga, com ampla distribuição geográfica e alto potencial de perdas tanto no campo quanto na indústria.

O conhecimento dos hábitos e da biologia da permite um melhor manejo e controle da população de determinados insetos. O desenvolvimento larval da broca, que mais causa danos a cana-de-açúcar, é influenciado pelas variações climáticas. O dano causado pela broca na produção canavieira torna a praga mais importante desta cultura, por sua ampla mobilidade e distribuição sendo encontrada indistintamente em toda a planta provocando prejuízos a partir dos primeiros ínstares (CRUZ, 2007).

O controle da *D. saccharalis* tem sido realizado, basicamente, pela aplicação de inseticidas químicos, porém não apresenta os efeitos desejados. Os inseticidas registrados para o controle da *D. saccharalis* na cultura da cana-de-açúcar no Brasil são triflumuron, carbofurano e fipronil (CRUZ, 2007). O controle biológico é feito por inimigos naturais, criados em laboratórios, liberados no campo, para determinação da intensidade de infestação.

Uma alternativa viável para o controle biológico da *D. saccharalis*, é a utilização do *B. thuringiensis*. A atividade de estirpes de Bt contra insetos da ordem Lepidoptera foi comprovado por diversos estudos realizados por renomados institutos de Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) e serviram como referência para a formulação de bioinseticidas disponíveis no mercado mundial.

As proteínas presentes na estirpe padrão (Btk) são pertencentes às classes Cry1 e Cry2, entretanto, é difícil de estabelecer a contribuição de cada toxina, pois a toxicidade de algumas estirpes aos insetos-alvo pode ocorrer devido a interações entre uma ou mais toxinas ocorrendo uma ação sinérgica responsável pela morte do inseto (SCHNEPF, *et al.*, 1998).

Segundo Monnerat (2003), várias pesquisas já demonstraram que para a estirpe apresentar a atividade tóxica a proteína deve se ligar a um receptor específico. Esse processo é fundamental para que os efeitos deletérios das proteínas Cry sejam observados, entretanto, o fato da proteína se ligar ao receptor não quer dizer que, necessariamente, que a mesma apresente toxicidade.



Com o objetivo de selecionar estirpes de *B. thuringiensis* tóxicas a broca-da-cana-de-açúcar realizou-se bioensaios seletivos com diversas estirpes da coleção de Bactérias de Invertebrados da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. As estirpes identificadas foram caracterizadas por meio de métodos bioquímicos e moleculares para identificação das proteínas responsáveis pela atividade. Buscou-se também avaliar a atividade tóxica de quatro proteínas Cry presentes no Btk, para determinação da dose letal necessária para matar 50% da população testada (CL<sub>50</sub>), bem como identificar a ligação dessas proteínas aos receptores de membrana da *D. saccharalis*. A metodologia utilizada e os resultados são apresentados neste capítulo.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 - Insetos

Os insetos foram fornecidos pela Embrapa Tabuleiros Costeiros localizada em Maceió/AL onde está implantada a criação de *D. saccharalis*. Os ovos foram obtidos na criação massal e enviados a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. A viabilidade dos ovos foi verificada imediatamente após a sua chegada. Em seguida os ovos foram colocados em dieta artificial [Açúcar (54 g), Farelo de soja (42 g), Gérmen de trigo (32 g), Ágar (18,8 g), Água (1000 mL), Ácido ascórbico (2 g), Ácido sórbico (1,2 g), Nipagin (1,8 g), Solução vitamínica (12 g)] (KING & HARTLEY, 1985) autoclavada e vertida em potes plásticos (9,5 x 6 cm) que foram mantidos em luz UV por 20 minutos. Os potes com a tampa furada e vedada com tecido fino “voil”, contendo a postura foram mantidos a temperatura ambiente até a eclosão. E posteriormente, transferidos para B.O.D (Maroni – Tipo B.O.D, MA - 403), mantidos a uma temperatura média de  $26^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$ , umidade relativa a 70% e fotofase de 14/10 h.

### 2.2 - Seleção das estirpes de *Bacillus thuringiensis*

Foram utilizadas 106 estirpes de *B. thuringiensis*, pertencentes à Coleção de Bactérias Patogênicas a Invertebrados da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Estas estirpes foram selecionadas por anteriormente já terem apresentado patogenicidade a outros lepidópteros. Destas, 13 estirpes haviam sido sorotipadas (1 *aizawai*, 4 *israelensis*, 1 *fokuokaensis*, 1 *galleriae*, 3 *kurstaki*, 1 *ostrinae*, 2 *tolworthi*), 87 estirpes que não pertenciam a não sorotipadas, e seis estirpes recombinantes de *B. thuringiensis* expressando as toxinas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1B, CryII e Cry2Aa.

Estas estirpes estão armazenadas em fitas de papel filtro em temperatura ambiente (25 °C), e foram isoladas a partir de amostras de solo e água de várias regiões do Brasil de acordo com a metodologia descrita no Protocolo da Organização Mundial de Saúde de 1987 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1987; MONNERAT *et al.*, 2001).

## 2.3 - Testes de Patogenicidade

Para avaliar o efeito das estirpes sobre as larvas da *D. saccharalis*, foi necessário o desenvolvimento de dois protocolos de bioensaio: um seletivo, para a pré-seleção das estirpes tóxicas e um de dose, para determinação da concentração letal necessária para matar 50% da população testada (CL<sub>50</sub>).

### 2.3.1 - Bioensaio Seletivo

O bioensaio seletivo consistiu na triagem inicial das 106 estirpes de *B. thuringiensis*, na busca de selecionar estirpes que tenham potencial para o controle da broca-da-cana. As estirpes foram cultivadas em meio Embrapa (MONNERAT *et al.*, 2007), em incubador rotativo a 200 rpm (Labline Instruments – Modelo 3595), 28 °C, durante 72 h, até sua completa esporulação.

Nos bioensaios seletivos foram utilizados copos plásticos (30 mL) e tampas de acrílico, com a dieta vertida no fundo do copo. Foi aplicado 150 µL de cultura bacteriana na superfície da dieta artificial. Para cada estirpe foram feitas três repetições, e um controle negativo, livre do patógeno. Após a secagem da cultura bacteriana presente na dieta, dez larvas de segundo ínstar de *D. saccharalis* foram colocadas em cada copo (PRAÇA *et al.*, 2004). Para a realização dos bioensaios os anti-contaminantes [Ácido sórbico (1,2 g) e Nipagin (1,8 g)] foram retirados da dieta, para evitar possíveis alterações nos resultados dos mesmos (Figura 3).

Todo o ensaio foi mantido nas mesmas condições da criação massal. A primeira avaliação foi feita 48 horas após o início do ensaio, ocasião em que as lagartas foram transferidas para novos copos, contendo dieta livre do patógeno. No sétimo dia após início do ensaio foi realizada a segunda e última avaliação. As lagartas da broca foram contadas e o número de insetos vivos e mortos nas três repetições foi avaliado determinando-se a porcentagem de mortalidade.

As estirpes que mataram 100% foram diluídas 50 vezes e novamente testadas. As que mantiveram a taxa mortalidade de larvas da broca em 75% foram então utilizadas para a continuação do ensaio.

### 2.3.2 – Determinação da concentração letal necessária para matar 50% da população testada (CL<sub>50</sub>)

Para a determinação da CL<sub>50</sub> (concentração letal para 50% da população testada) foram selecionadas as estirpes que causaram 75% de mortalidade no bioensaio seletivo. As estirpes tóxicas foram cultivadas por 72 h em meio EMBRAPA a 200 rpm (Labline Instruments – Modelo 3595) e 28 °C. Em seguida foram centrifugadas a 12.800 x g por 30 minutos, a 4 °C (Centrifuga BR4i, Jouan), congeladas por 16 h e liofilizadas por 18 h em liofilizador (Chris Alpha 2-4 LD Plus). Depois de liofilizado, os materiais foram pesados na quantidade de 1 mg e adicionou-se aos mesmos 10 mL de água destilada estéril. Após completa homogeneização em agitador tipo “vortex”, obteve-se a suspensão I. A partir desta suspensão, obteve-se a suspensão II, pegando-se 571,4 mL da suspensão I e adicionaram-se 428,6 mL de água, obtendo-se uma concentração final de 571,4 µg/mL. Daí por diante, preparou-se 10 mL de cada uma das diluições conforme descrito na tabela 1, misturando um determinado volume da suspensão I que se apresenta na coluna 2 da tabela 1 com o volume de água correspondente na coluna 3 da mesma tabela, utilizando-se concentrações de esporos e cristais entre 20 e 2000 ng/mL. Em seguida, os bioensaios foram realizados espalhando-se 35 µL de cada uma das diluições em cada um dos 24 poços das placas de cultivo de células. A cultura bacteriana foi absorvida pela dieta e em seguida uma larva de segundo estágio foi colocada em cada poço. Uma placa foi deixada sem a bactéria como testemunha. As placas foram devidamente fechadas com tampas de acrílico e ligas elásticas e colocadas na sala de bioensaios nas mesmas condições de criação dos insetos. Foram testados dez diluições e um controle por bioensaio, com 24 indivíduos por tratamento. A primeira leitura foi feita 48 horas após o início do ensaio, ocasião em que as lagartas foram transferidas para copinhos de plástico de 50 mL, contendo dieta livre do bacilo. No sétimo dia foi feita a segunda e última avaliação.

Os dados de mortalidade obtidos foram analisados através de Probits (Finney, 1971) e a concentração letal (CL<sub>50</sub>) foi determinada. *B. thuringiensis* subespécie *kurstaki* HD-1 (Btk) foi utilizado como padrão e controle positivo.

Após a liofilização, o material foi pesado para ser usado no bioensaio. Foram preparadas diluições contendo solução salina e 0,001 g do pó das bactérias a serem utilizadas. Foram aplicados 35 µL destas sobre a dieta. Para o cálculo da CL<sub>50</sub>, foram testadas dez concentrações para cada estirpe (Tabela 1) (PRAÇA *et al.*, 2004). Foi

preparado também, um controle negativo, livre da bactéria. O bioensaio seguiu o protocolo descrito por Praça *et al.* (2004), adaptado quanto a dieta, citada no item 4.1. A  $CL_{50}$  foi determinada de acordo com os dados de mortalidade obtidos sete dias após o início do ensaio, analisados através de análise de Probits (FINNEY, 1971) utilizando o programa estatístico PoloPC .

Tabela 1 - Diluições e concentrações finais utilizadas no bioensaio de dose contra *D. saccharalis*

	Bactéria (mg)	Água (mL)	Concentração ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
Suspensão I ( $\mu\text{L}$ )	1	1000	1000
	Suspensão I (mL)	Água (mL)	Concentração ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
Suspensão II ( $\mu\text{g}$ )	571,4	428,6	571,4
Dose	Suspensão II ( $\mu\text{L}$ )	Água (mL)	Concentração ( $\text{ng}/\text{cm}^2$ )
1	2000	800	2000
2	1200	880	1200
3	720	928	720
4	432	956,8	432
5	259	974,1	259
6	155	984,5	155
7	93	990,7	93
8	56	994,4	56
9	34	996,6	34
10	20	998	20

## 2.4 - Caracterização Bioquímica

As estirpes tóxicas tiveram seus perfis protéicos analisados de acordo com o protocolo de extração de proteínas descrito por Lecated *et al.*, (1991) com modificações. Para isso, as estirpes bacterianas foram crescidas em meio Embrapa por 72 horas em incubador rotativo a 28 °C e 200 rpm (Labline Instruments – Modelo 3595). As culturas bacterianas foram transferidas na quantidade de 1,5 mL para tubos de polipropileno de 1,5 mL, previamente autoclavados, e em seguida centrifugadas a 12000 x g, em microcentrífuga (Hettich – Zentrifugen, Mikro 200), por 15 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e os sedimentos lavados com 1,5 mL de NaCl 5 M por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e as paredes do tubo foram secas com papel filtro. Os sedimentos foram lavados por duas vezes com 1,5 mL de PMSF (fluoreto de fenil metil sulfonil) a 1 mM e centrifugados a 12000 x g por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado, e este procedimento repetido por mais duas vezes. Por fim, o sedimento foi ressuspenso em 300 µL de PMSF 1 mM e armazenados a -20 °C.

As análises dos perfis protéicos das estirpes foram realizadas, conforme procedimento descrito por Laemmli (1970), através da eletroforese em gel de poli(acrilamida)-SDS a 12% (SDS-PAGE). Alíquotas de 20 µL das preparações de esporos-cristais foram diluídas em 8 µL tampão de amostra de proteína 4X (250 mM Tris-HCl, pH 6,8, 40% Glicerol, 0,14 mM SDS, 10% β-Mercaptoetanol, 0,1% Azul de Bromofenol) fervidas a 100 °C por 5 minutos e aplicadas em gel de poli(acrilamida) SDS-PAGE 10%. Cinco microlitros de marcador de proteína (marcador de massa molecular Rainbow da GE) foi utilizado. A eletroforese foi realizada em um aparelho de eletroforese vertical (Hofer miniVE - Amersham Pharmacia), contendo tampão de corrida 1X (Tris-base, glicina, SDS 10%), a voltagem constante de 120 V, por aproximadamente 2 horas e 30 minutos. O gel foi corado com 20 mL de solução corante de Comassie blue (40% metanol e 25% de Comassie blue 250-R) por 16 horas e descorado com 20 mL de solução descorante (40% de metanol, 10% de ácido acético) por 1 - 2 horas até visualização dos perfis protéicos das estirpes. Para comparação, uma estirpe (S1450) de Bt (*B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*) foi usada como padrão, por se tratar da estirpe referência para lepidópteros.

## 2.5 - Caracterização molecular

A extração do DNA total das estirpes selecionadas foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Bravo *et al.*, (1998). As estirpes foram cultivadas em meio ágar Embrapa sólido (MONNERAT *et al.*, 2007), mantidas a 30 °C durante 16 horas. Após o crescimento, uma alçada do cultivo com a bactéria foi colocada em tubo de polietileno, contendo 300 µL de água Milli-Q estéril e, em seguida as amostras foram homogeneizadas em aparelho Vortex (Fisher, G-560) e mantidas por uma hora no freezer a -20 °C, sendo então fervidas a 100 °C por 10 minutos para lise das células. Após esta etapa o material foi centrifugado a 12000 x g por 30 segundos, em centrífuga refrigerada (4 °C) para evitar degradação do DNA (Centrifuga BR4i, Jouan) e o sobrenadante foi transferido cuidadosamente para um novo tubo estéril, e a reação da PCR, foi processada.

Diferentes oligonucleotídeos (Tabela 2) foram utilizados nas reações da PCR, 5 µL do sobrenadante da cultura, foram transferidos para um novo tubo de polipropileno de 0,2 mL contendo 0,5 µM de cada oligonucleotídeo, 0,2 mM de dNTP mix, tampão de Taq 1X e 2,5 U de Taq DNA polimerase (5,0 U), totalizando um volume final de 30 µL. Foram utilizados oligonucleotídeos para a identificação dos seguintes genes: *cry1*, *cry2*, *cry3*, *cry4*, *cry5*, *cry7*, *cry8*, *cry9*, *cry10*, *cry11*, *cry12*, *cry13*, *cry14*, *cry17*, *cry19*, *cry21*, *cry24*, *cry25*, *cry27*, *cry29*, *cry30*, *cry32*, *cry39*, *cry40*, *cyt1* e *cyt2* (CERON *et al.*, 1995; BRAVO *et al.*, 1998; IBARRA *et al.*, 2003).

Para a realização da reação da PCR uma alíquota de 25 µL de cada produto de PCR foi misturada com 5 µL tampão de amostra e aplicada em gel de agarose 1,5%. A corrida eletroforética foi processada em tampão TBE 1X (Tris-base, Ácido bórico, EDTA 0,5 M - pH 8,0). Após a eletroforese, o gel foi corado com brometo de etídio diluído em água na concentração de 1µg/mL por 20 minutos, e descorado em água destilada por 15 minutos. O gel foi visualizado em transluminador sob luz UV e fotografado em foto-documentador (Eagle Eye, Stratagene), e por fim, descartado. As condições de amplificação foram descritas por Ceron *et al.*, (1994, 1995), Bravo *et al.*, (1998) e Ibarra *et al.*, (2003).

A tabela 2 aponta a sequência dos oligonucleotídeos utilizados e o tamanho esperado dos produtos da PCR.

Tabela 2 - Características dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR.

Oligos	Sequência	Genes	Bandas de DNA (pb)	Cristal protéico (kDa)	Tm (°C)
cry1 Ceron <i>et al.</i> , 1995	5'TGTAGAAGAGGAAGTCTATCCA (d) <sup>1</sup> 5'TATCGGTTTCTGGGAAGTA (r) <sup>2</sup>	<i>cryIAa</i>	272	133	48
		<i>cryIAb</i>	284	130	
		<i>cryIAc</i>	272	133	
		<i>cryIB</i>	290	140	
		<i>cryIC</i> ,	284	132-	
		<i>cryID</i>	275	134	
		<i>cryIEa</i>	290	133	
		<i>cryIEb</i>	284	133	
		<i>cryIFa</i>		132- 134	
cry1 Ceron <i>et al.</i> , 1994	5'TGTAGAAGAGGAAGTCTATCCA (d) 5'TTGGAGCTCTCAAGGTGTAA (r)	<i>cryIAa</i>	246	133	53
cry1 esp. Ceron <i>et al.</i> , 1994	5'CAGCCGATTTACCTTCTA (d) 5'TTGGAGCTCTCAAGGTGTAA (r)	<i>cryIAd</i>	171	133	53
cry1 esp. Ceron <i>et al.</i> , 1994	5'AACAACCTATCTGTTCTTGAC (d) 5'CTCTTATTATACTTACACTAC (r)	<i>cryIAb</i>	216	130	53
cry1 esp. Ceron <i>et al.</i> , 1994	5'GTTAGATTAAATAGTAGTGG (d) 5'TGTAGGTGGTACTGTTATTG (r)	<i>cryIAc</i>	180	133	53
cry1 esp. Ceron <i>et al.</i> , 1994	5'CTTCATCACGATGGAGTAA (d) 5'CATAATTTGGTCGTTCTGTT (r)	<i>cryIB</i>	367	140	53
cry1 esp. Ceron <i>et al.</i> , 1994	5'AAAGATCTGGAACACCTTT (d) 5'CAAACCTCTAAATCCTTTCAC (r)	<i>cryIC</i>	130	134	53
cry1 esp. Ceron <i>et al.</i> , 1994	5'CTGCAGCAAGCTATCCAA (d) 5'ATTCAATTGTCAAGGCCTG (r)	<i>cryID</i>	290	132	53
cry1 esp. Ceron <i>et al.</i> , 1994	5'GTATAAGTGGAGGGATCCATATG (d) 5'GGATCCCTACATGTTACGCTT (r)	<i>cryII</i>	2100	72	54
Cry2 Bravo <i>et al.</i> , 1998	5'GAGTTTAATCGACAAGTAGATAATTT3' (d) 5'GGAAAAGAGAATATAAAAATGGCCAG3' (r)	<i>cry2</i>	526	72	51



Oligos	Sequência	Genes	Bandas de DNA (pb)	Cristal protéico (kDa)	T <sub>m</sub> (°C)
cry3 Ceron <i>et al.</i> , 1995	5'TTAACCGTTTTTCGCAGAGA (d) 5'TCCGCACTTCTATGTGTCCAAG (r)	<i>cry3A</i> <i>cry3B</i> , <i>cry3C</i> <i>cry3Cb</i> <i>cry3Cc</i> <i>cry3D</i> <i>cry3F</i> <i>cry3G</i> <i>cry4A</i>	703 709 694 718 652 733	73	48
cry4 Ibarra <i>et al.</i> , 2003	5'TCAAAGATCATTTCAAAATTACATG (d) 5'CGGCTTGATCTATGTCATAATCTGT (r)		459	72	50
cry4 Ibarra <i>et al.</i> , 2003	5'CGTTTTCAAGACCTAATAATAATACC (d) 5'CGGCTTGATCTATGTCATAATCTGT (r)	<i>cry4B</i>	321	72	50
cry5+12+ 14+21 Bravo <i>et al.</i> , 1998	5'TTCGTAAATTGGTCAATCAAGCAA (d) 5'AAGACCAAATTC AATACCAGGGTT (r)	<i>cry5Aa,Ab</i> , <i>Ac</i> , <i>cry5B</i> <i>cry12</i> <i>cry14</i> <i>cry21</i>	474 477 483 489	152- 142 135- 140 142 132	50
cry8 Bravo <i>et al.</i> , 1998	5'ATGAGTCCAATAATCTAAATG (d) 5'TTTGATTGAATGAGTTCTTCCACTC (r)	<i>cry8A</i> <i>cry8B</i> <i>cry8C</i>	376	131 134 130	49
cry9 esp. Bravo <i>et al.</i> , 1998	5'GTTGATACCCGAGGCACA (d) 5'CCGCTTCCAATAACATCTTTT (r)	<i>cry9A</i>	571	130	
cry9 esp. Bravo <i>et al.</i> , 1998	5'TCATTGGTATAAGAGTTGGTGATAGCA (d) 5'CCGCTTCCAATAACATCTTTT (r)	<i>cry9B</i>	402	130	51
cry9 esp. Bravo <i>et al.</i> , 1998	5'CTGGTCCGTTCAATCC (d) 5'CCGCTTCCAATAACATCTTTT (r)	<i>cry9C</i>	306	130	51
cry10 Ibarra <i>et al.</i> , 2003	5'TCAATGCTCCATCCAATG (d) 5'CTTGTATAGGCCTTCCTCCG (r)	<i>cry10</i>	348	78	51
cry11 Bravo <i>et al.</i> , 1998	5'TTAGAAGATACGCCAGATCAAGC (d) 5'CATTCTACTTGAAGTTGTTAATCCC (r)	<i>cry11A</i> <i>cry11B</i>		72 81-84	50
			305		

Oligos	Sequência	Genes	Bandas de DNA (pb)	Cristal protéico (kDa)	Tm (°C)
cry13 Bravo <i>et al.</i> , 1998	5'CTTTGATTATTTAGGTTTAGTTCAA (d) 5'TTGTAGTACAGGCTTGTGATTC (r)	<i>cry13</i>	313	88	50
cry17+27 Ibarra <i>et al.</i> , 2003	5'CATTGTTCTACTTGGTATAA (d) 5'GATACAATTACATCTCCTCCTGTA (r)	<i>cry17</i> <i>cry27</i>	832 895	72	47
cry19+39 Ibarra <i>et al.</i> , 2003	5'AAGCTGCGAATCTGCATTTACTTTT (b) 5'CTCATAATTTTCCGTCCATAAAT (r)	<i>cry19Aa</i> <i>cry19Ba</i> <i>cry39</i>	616 631 619	75	51
cry25 Ibarra <i>et al.</i> , 2003	5'GGCTTCTAGATCAGGAGATGG (d) 5'CATCATAATCAGAGCGCAGG (r)	<i>cry25</i>	560	76	53
cry24+40 Ibarra <i>et al.</i> , 2003	5'TTATCAATGTTAAGGGATGC (d) 5'ACTGGATCTGTGTATATTTTCCTAG (r)	<i>cry24Aa</i> <i>cry40Aa</i>	304 366	76	48
cry29 Ibarra <i>et al.</i> , 2003	5'TCAGCTCCAATAACTGGTG (d) 5'GCATGTCATCCCCTTGTCTA (r)	<i>cry29</i>	451	74,4	50
cry30 Ibarra <i>et al.</i> , 2003	5'AACTCACACATCCTCCATCG (d) 5'ATCGAAGGCAATCATTCG (r)	<i>cry30</i>	265	77,8	50
cry30 Ibarra <i>et al.</i> , 2003	5'TGGTCGGGAGAGAATGGATGGA (d) 5'ATGTTTGCACACACCATTTTC (r)	<i>cry32Aa</i> <i>cry32Ba</i> <i>cry32Ca</i> <i>cry32D</i>	677 676	82	54
cyt1 Bravo <i>et al.</i> , 1998	5' AACCCTCAATCAACAGCAAGG (d) 5' GGTACACAATACATAACGCCACC (r)	<i>cyt1Aa</i> <i>cyt1Ab</i>	522 525	27	51
cyt2 Ibarra <i>et al.</i> , 2003	5' ATTACAAATTGCAAATGGTATTCC (d) 5' TTTCAAACATCCACAGTAATTTCAAATGC (r)	<i>cyt2Aa</i> <i>cyt2Ba</i> <i>cyt2Bb</i> <i>cyt2Ca</i>	355	29	50

1: (d) iniciador direto 5'- 3'

2: (r) iniciador reverso 5'- 3'

## 2.6 - Purificação, solubilização e quantificação das proteínas

As estirpes recombinantes S2211 (Cry1Aa), S2210 (Cry1Ab), S2212 (Cry2Aa) e S2209 (Cry1Ac). Essas estirpes foram crescidas a 28 °C e 200 rpm durante 72 h em meio de esporulação [8 g/L de Caldo nutriente; 0,25 g/L de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 1 g/L de KCl; 0,002 g/L de MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O; 0,0732 g/L de Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>).7H<sub>2</sub>O; 0,0056% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (v/v); 0,098 g/L de CaCl<sub>2</sub>] (LERECLUS *et al.*, 1995), contendo 10 µg/mL de eritromicina somente no meio das estirpes transformadas. Os esporos e cristais foram centrifugados, primeiramente, por três vezes a 10.000 rpm a 4 °C (Jouan BR4i) por 10 minutos, com tampão contendo 0,3 M de NaCl e 0,01 M de EDTA (pH 8,0), e em seguida com tampão contendo PMSF a 1 mM. O sobrenadante foi descartado e o sedimento recuperado com tampão TTN (20 mM de tris, 300 mM de NaCl, 0,1% de triton x-100, pH 7,2) este foi centrifugado a 10.000 rpm a 4 °C (Jouan BR4i) por 10 minutos. O procedimento foi repetido por três vezes. Após esta etapa o material foi sonificado a três pulsos de um minuto com intervalos iguais de um minuto a 15 W (VirSonic CelDisrutter 16-850). A purificação das estirpes recombinantes selecionadas foi realizada por meio de gradiente de sacarose de acordo com protocolo descrito por Thomas & Ellar (1983). Posteriormente, foram recuperados com adição de triton 1% (v/v) e PMSF 1 mM e solubilizados em tampão alcalino decarbonato de sódio a 50 mM e pH 10,5 com 0,2% (v/v) de β-mercaptoetanol por duas horas a 37 °C com agitação constante de 60 rpm. Depois desse processo, a amostra foi centrifugada por 5 minutos a 12000 x g. Em seguida, a proteína solúvel foi quantificada com Protein Assay (Bio Rad) pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Para observação da integridade e massa molecular das proteínas foi feito um gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12%, de acordo com Laemmli (1970). O gel foi corado e fixado com 20 mL de solução corante de Comassie blue (40% metanol, ácido acético 10% e Comassie blue 0,1%) por cerca de 16 horas sob leve agitação e descorado com 20 mL de solução descorante (40% de metanol, 10% de ácido acético) por 1-2 horas até visualização dos perfis protéicos das estirpes.

## **2.7 - Ativação das proteínas com tripsina**

As proteínas puras Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa foram quantificadas pelo método de Bradford e em seguida incubadas com a enzima tripsina durante duas horas a 37 °C com leve agitação. A concentração da tripsina variou de acordo com a concentração das proteínas numa proporção de 10:1 de proteína:enzima, respectivamente. Para inativação da enzima foi adicionado PMSF a 1 mM, e em seguida foi feita uma centrifugação para recuperar o sobrenadante. Para observação da integridade das proteínas e sua massa molecular foi feito um gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12%.

## **2.8 - Biotinilação das proteínas**

As proteínas ativas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa foram biotiniladas com auxílio do kit ECL Protein Biotinylation System (Amersham) de acordo com as recomendações do fabricante. Foram submetidas a eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12%. Um miligrama das proteínas foi incubado com tampão bicarbonato (Amersham) e 40 µL de biotina durante uma hora a temperatura ambiente, sob leve agitação. As proteínas conjugadas com biotina foram adicionadas à coluna. As proteínas foram eluídas da coluna pela adição de 10 mL de PBS 1X. A partir disso, dez frações contendo 1 mL de solução foram coletadas e as proteínas quantificadas (como descrito anteriormente) em cada fração. As proteínas foram submetidas a eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12%. Em seguida, foi utilizado o protocolo de coloração de prata adaptado de Blum *et al.* (1987) para corar o gel. O gel foi fixado em solução de metanol 40% e ácido acético 10% por cerca de 16 h, sob leve agitação. Em seguida, o gel foi incubado três vezes com uma solução de etanol 50% (v/v) durante 20 minutos. Adicionou-se 30 mL da solução tiosulfato (20 mg/mL de tiosulfato de sódio) durante um minuto. O gel foi lavado três vezes com água destilada. A partir disso, o gel foi incubado com 30 mL de solução de prata [2 mg/mL de nitrato de prata e formaldeído 0,001% (v/v)] durante 20 minutos. O gel foi lavado, novamente, três vezes com água destilada. Adicionou-se a solução reveladora [0,06 g/mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, formaldeído 0,001% (v/v) e solução tiosulfato 2% (v/v)]. O gel foi submetido a leve agitação até a visualização das proteínas. A reação foi interrompida com solução de metanol 40% (v/v) e ácido acético 10% (v/v).

## **2.9 - Ativação das proteínas com proteases (suco gástrico)**

A extração das proteases foi feita de acordo com o protocolo de Silva-Werneck & Ellar (2008). As proteases foram extraídas a partir de 10 intestinos médios das lagartas de *D. saccharalis* de quarto estágio. Os intestinos íntegros foram retirados com auxílio de pinças, lavados e incubados em 500 µL de tampão de dissecação para manutenção da integridade das paredes do intestino e do pH (sacarose 250 mM e tris-HCl 5 mM, pH 8,0). Após este passo, 1 mL de tampão de homogeneização gelado (DTT 10 mM e Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 50 mM, pH 10,5) foi adicionado. Os intestinos foram homogeneizados com quatro pulsos (Blender – polytron, Glass-Col® Terre Haut USA) com 1 mL de tampão de homogeneização gelado. O material insolúvel foi removido por centrifugação a 12000 x g, por 5 minutos a 4 °C e o sobrenadante, contendo as proteínas solubilizadas, foi esterilizado por filtração (0,22 µm) e as proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford, como descrito anteriormente, e alíquotadas em volumes de 250 µL. As alíquotas foram armazenadas a – 80 °C até sua utilização.

## **2.10 - Extração de BBMVs (“Brush Border Membrane Vesicles” - Vesículas da Borda Escovada da Membrana Apical das Células do Intestino).**

As BBMVs foram obtidas a partir dos intestinos médios de *D. saccharalis* do quarto estágio de desenvolvimento. Foram retirados com o auxílio de pinças, lavados e conservados em solução tampão (Manitol 200mM, DDT 1 mM e HEPES-Tris 1 mM, pH 7,4) a -80 °C (WOLFESBERGER *et al.*, 1987). Um grama dos intestinos foram submetidos a nove pulsos a 2.250 rpm em um aparelho homogeneizador “blender-polytron” (Glass-Col® Terre Haut USA) juntamente com 10 mL de tampão de homogeneização contendo 300 mM de manitol, 17 mM de Tris-HCl, 10 mM de Hepes, 2 mM de DTT, 1 mM de EDTA e 1 mM de PMSF. Adicionou-se 10 mL de solução gelada de MgCl<sub>2</sub> a 24 mM e incubou-se a mistura em gelo por 15 min. A reação foi centrifugada a 2.500 x g por 15 min a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e centrifugado novamente a 30.000 x g por 30 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado em 5 mL de tampão de homogeneização e 5 mL de MgCl<sub>2</sub> a 24 mM. Novamente a mistura foi incubada em gelo durante 15 min. A reação foi centrifugada a 2.500 x g por 15 min a 4 °C. O sobrenadante foi transferido

para outro tubo e centrifugado novamente a 30.000 x g por 30 min a 4 °C. O sobrenadante foi novamente descartado e o sedimento ressuspensionado em 5 mL de água bi-distilada fria. Após todas essas centrifugações, as amostras foram submetidas a três pulsos do aparelho homogeneizador a 2.250 rpm. Em seguida, as mesmas foram dialisadas durante aproximadamente 16 horas a 4 °C em dois litros de uma solução (pH 7,4) contendo 150 mM de KCl, 2 mM de EGTA, 0,5 mM de EDTA, 10 mM de Hepes. Depois desse processo as BBMVs foram purificadas, quantificadas pelo método de Bradford e divididas em pequenas alíquotas e armazenadas a temperatura de -80 °C para posterior ensaio de ligação com as proteínas Cry.

### **2.11 - Ensaio de ligação das toxinas Cry aos receptores de membrana intestinais (BBMV's)**

O ensaio de ligação foi realizado como descrito por Aranda *et al.*, (1996), para observar a ligação das proteínas testadas às BBMVs extraídas do intestino médio. As proteínas biotinizadas (10 nM) foram incubadas com 10 µg de BBMVs em 100 µL de tampão de ligação [PBS 1X (pH 7,6), BSA 0,1% (m/v), Tween 20 0,1% (v/v)] à 25°C por uma hora sob leve agitação. Em seguida, o material foi centrifugado por dez minutos a 12000 x g para remoção das proteínas não ligadas às BBMVs. Foi adicionado às BBMVs, 80 µL de tampão de ligação [PBS 1X/ Tween 20 0,1%], centrifugado mais uma vez por dez minutos a 14000 x g e fervido por três minutos para ser aplicado no gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 9%. A transferência foi realizada à corrente constante de 350 mA em sistema submarino (Hoefer) por uma hora em tampão de transferência [Tris Base 25 mM, Glicina 192 mM e metanol 20% (v/v)]. A membrana de nitrocelulose foi incubada por 16 h a 4 °C com PBS 1X para que fosse renaturada. Em seguida a membrana contendo as ligações das toxinas marcadas com as BBMVs foi incubada com streptavidina conjugada com peroxidase (Amersham) 1 : 6000 em 30 mL de PBS 1X por uma hora, para ativar a marcação das toxinas presentes na membrana. A revelação da membrana foi feita com o auxílio do kit Super Signal Chemiluminescence Substrate (Pierce) de acordo com as especificações do fabricante.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 - Insetos

As larvas de *D. saccharalis* eclodiram e cresceram conforme esperado nas condições de temperatura, umidade relativa do ar e fotoperíodo utilizado neste trabalho. O percentual de mortalidade registrado foi no máximo de 10%. Essas larvas foram utilizadas em bioensaios, com a finalidade de verificar o efeito tóxico de Bt à broca-da-cana. A dieta adaptada de acordo com o protocolo de King & Hartley (1985) foi determinante para manter a população em condições ideais. Resultados semelhantes foram obtidos por Gitahy *et al.*, (2007).

#### 3.2 - Seleção das estirpes

Dois tipos de bioensaios foram estabelecidos neste trabalho, baseado em protocolos desenvolvidos para outras espécies de Lepidoptera (Praça *et al.*, 2004). Essas metodologias de bioensaio poderão servir para melhorar a eficiência do estudo para controle de *D. saccharalis*, e será um meio de avaliação do impacto de proteínas Cry de Bt, com potencial inseticida na sua fase larval. Estudos realizados na Venezuela, por Ramos *et al.*, (2004) mostraram que isolados de *B. thuringiensis* apresentam toxicidade pela *D. saccharalis* nos primeiros ínstares de desenvolvimento.

Dentre as 106 estirpes testadas, 16 estirpes causaram mortalidade igual a 100% em bioensaios seletivos e quatro das estirpes recombinantes de *B. thuringiensis* expressando as toxinas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2 também apresentaram toxicidade à *D. saccharalis*.

Pode-se observar que as estirpes tóxicas pertenciam aos sorotipos *kurstaki* (S1258, S1264, S2193 e S2195), *tolworthi* (S1303 e S1304), *aizawai* (S1295), *galleriae* (S1298) e *morrisoni* (S1301). Entretanto as pertencentes aos sorotipos *ostrinae* e *israelensis* não foram tóxicas. Sete estirpes não sorotipadas foram tóxicas e 85 não foram. Os resultados de toxicidade de todas as estirpes testadas podem ser visualizados na tabela 3.

Tabela 3: Estirpes testadas, sorotipo e toxicidade à *D. saccharalis*.

Estirpe	Sorotipo	Toxicidade à <i>D. saccharalis</i>	Estirpe	Sorotipo	Toxicidade à <i>D. saccharalis</i>
S119	Ns	-	S1258	<i>kurstaki</i>	+
S135	Ns	-	S1262	<i>ostrinae</i>	-
S148	Ns	-	S1264	<i>kurstaki</i>	+
S159	Ns	-	S1272	Ns	-
S165	<i>israelensis</i>	-	S1274	Ns	-
S166	Ns	-	S1275	Ns	-
S198	Ns	-	S1286	Ns	-
S273	Ns	-	S1287	Ns	+
S298	Ns	-	S1288	<i>israelensis</i>	-
S299	Ns	-	S1289	Ns	+
S383	Ns	-	S1290	Ns	-
S385	Ns	-	S1291	<i>israelensis</i>	-
S392	Ns	-	S1292	<i>israelensis</i>	-
S396	Ns	-	S1295	<i>aizawai</i>	+
S398	Ns	-	S1298	<i>galleriae</i>	+
S401	Ns	-	S1301	<i>morrisoni</i>	+
S413	Ns	-	S1303	<i>tolworthi</i>	+
S464	Ns	-	S1304	<i>tolworthi</i>	+
S503	Ns	-	S1307	Ns	+
S508	Ns	-	S1323	Ns	-
S513	Ns	-	S1338	Ns	-
S602	Ns	+	S1387	Ns	-
S609	Ns	-	S1398	Ns	-
S610	Ns	-	S1530	Ns	-
S647	Ns	-	S1542	Ns	-
S667	Ns	-	S1562	Ns	-
S675	Ns	-	S1642	Ns	-
S745	Ns	-	S1664	Ns	+
S757	Ns	-	S1703	Ns	-



Estirpe	Sorotipo	Toxicidade à <i>D. saccharalis</i>	Estirpe	Sorotipo	Toxicidade à <i>D. saccharalis</i>
S764	Ns	-	S1878	Ns	-
S761	Ns	-	S1942	Ns	-
S779	Ns	-	S1966	Ns	-
S802	Ns	-	S1986	Ns	-
S807	Ns	-	S1979	Ns	+
S808	Ns	-	S1950	Ns	-
S813	Ns	-	S2001	Ns	-
S832	Ns	-	S2005	Ns	-
S874	Ns	-	S2006	Ns	-
S891	Ns	-	S2007	Ns	-
S904	Ns	-	S2019	Ns	-
S905	Ns	-	S2021	Ns	+
S906	Ns	-	S2143	Ns	-
S908	Ns	-	S2153	Ns	-
S949	Ns	-	S2168	Ns	-
S1090	Ns	-	S2193	<i>kurstaki</i>	+
S1115	Ns	-	S2195	<i>kurstaki</i>	+
S1125	Ns	-	S2205	Ns	-
S1129	Ns	-	S2302	Ns	-
S1251	Ns	-	S2364	Ns	-

(+) patogenicidade positiva, (-) patogenicidade negativa, (Ns) não sorotipadas

Com o objetivo de refinar os dados, foram realizados bioensaios com a cultura diluída. Quatro estirpes mataram entre 0% a 49%, 8 entre 50% a 74% e 3 acima de 75% em 24 horas (Tabela 4).

Tabela 4 – Estirpes que apresentaram mortalidade superior a 75% em 24 horas contra larvas de segundo ínstar de *D. saccharalis*.

Estirpes	Mortalidade (%)
S602	75
S1258	43,3
S1264	75
S1287	43,3
S1289	70
S1295	40
S1298	40
S1301	80
S1303	50
S1304	50
S1307	60
S1664	67
S1979	70
S2021	70
S2193	43,3
S2195	50

As três estirpes que causaram mais de 75% de mortalidade foram: S602, S1264 e S1301. Essas três estirpes foram então submetidas a novos bioensaios para determinação da  $CL_{50}$  (Tabela 5). Dentre elas a mais tóxica à *D. saccharalis* foi a S602 ( $CL_{50}$  de 8,96 ng/cm<sup>2</sup>), seguida do padrão Btk (12,46 ng/cm<sup>2</sup>), da estirpe S1264 (20,43 ng/cm<sup>2</sup>) e S1301 (43,28 ng/cm<sup>2</sup>) (Tabela 5). A toxicidade da estirpe S602 foi semelhante, estatisticamente, a das estirpes S1264 e do padrão Btk, diferente entretanto, da S1301. A toxicidade de S1264, S1301 e Btk foram também semelhantes entre si.

Tabela 5 – CL<sub>50</sub> das estirpes de *B. thuringiensis* contra larvas de segundo ínstar de *D. saccharalis*

Estirpes	CL <sub>50</sub> (ng/cm <sup>2</sup> )	
S602	8,96 (5,46 – 14,61)	a
S1264	20,43 (14,53 – 38,71)	ab
S1301	43,28 (19,30 – 72,73)	b
S1450(Btk)	12,46 (2,34 – 20,46)	ab

- os números entre parêntesis correspondem ao intervalo de confiança a 95%.

- a, ab, b - agrupamento estatístico, com base no intervalo de confiança a 95%, das estirpes testadas.

Foi demonstrado que estirpes de *B. thuringiensis* pertencentes aos sorotipos *kurstaki* e *tolworthi* são tóxicas à *D. saccharalis* (GITAHY *et al.*, 2007). Resultados semelhantes foram obtidos por Rosas-Garcia (2006), com isolado de sorotipo *kurstaki*, que demonstrou atividade tóxica contra a broca-da-cana no México. Neste trabalho, estirpes pertencentes a esses sorotipos também foram tóxicas, além de estirpes pertencentes aos sorotipos *aizawai*, *gallerie* e *morrisoni*. É interessante mencionar que as subespécies *aizawai*, *kurstaki* e *gallerie* estão relatadas como tóxicas a insetos da ordem Lepidoptera e normalmente apresentam as toxinas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa e Cry2Ab, descritas como tóxicas a insetos da ordem Lepidoptera (KWA *et al.*, 1998; MONNERAT *et al.*, 1999; IBARGUTXI *et al.*, 2005; PIGOTT & ELLAR, 2007).

### 3.3 - Caracterização bioquímica e molecular das estirpes de Bt

As 16 estirpes que causaram 100% de mortalidade à *D. saccharalis*, foram caracterizadas de acordo com seu perfil protéico e molecular.

Por meio de análise do perfil protéico foi possível observar que as preparações das estirpes selecionadas eram compostas de dois polipeptídeos principais de aproximadamente 130 e 65 kDa, que correspondem ao perfil do padrão Btk (HÖFTE *et al.*, 1988). Dentre as 16 estirpes, 15 apresentaram a proteína de 130 kDa, enquanto apenas 9 apresentaram ainda a de 65 kDa. A análise das proteínas das estirpes selecionadas por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) (HÖFTE & WHITELEY, 1989) possibilita conhecer o número e a massa molecular das toxinas

além de auxiliar na identificação do grupo Cry o qual pertencem. É importante observar que proteínas correspondentes ao tamanho de 130 kDa estão relacionadas com o padrão característico das proteínas Cry efetivas contra coleópteros e lepidópteros, e o perfil de 65 kDa é característico das proteínas do grupo Cry2, que é ativa contra lepidópteros e dípteros (CRICKMORE *et al.*, 2010).

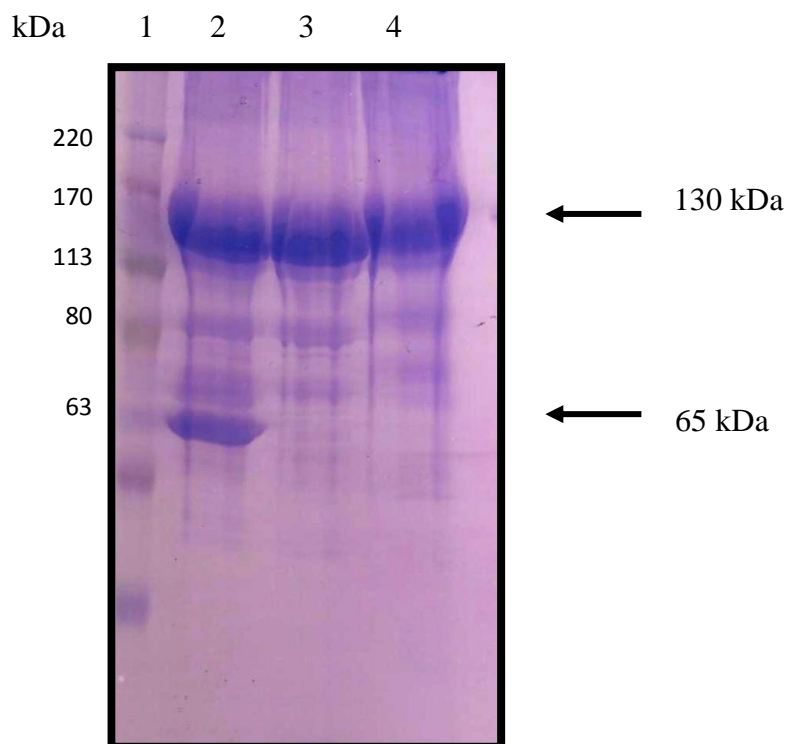


Figura 4: SDS-PAGE 12% do complexo esporo-cristal das estirpes de *B. thuringiensis* S602, S1264 e S1301. 1: marcador de massa molecular Rainbow da GE; 2: S602; 3: S1264 e 4: S1301.

Foram obtidos amplicons apenas nas reações de PCR realizadas com os iniciadores específicos do tipo *cry1* e *cry2*. Não houve resultado positivo com nenhum dos outros iniciadores *cry3*, *cry4*, *cry5*, *cry7*, *cry8*, *cry9*, *cry10*, *cry11*, *cry12*, *cry13*, *cry14*, *cry17*, *cry19*, *cry21*, *cry24*, *cry25*, *cry27*, *cry29*, *cry30*, *cry32*, *cry39*, *cry40*, *cyt1* e *cyt2* (CERON *et al.*, 1995; BRAVO *et al.*, 1998; IBARRA *et al.*, 2003) (Tabela 2). A composição gênica de cada estirpe está apresentada na tabela 6.

O perfil gênico variou entre as estirpes. Os amplicons produzidos com maior frequência foram os correspondentes aos genes *cry1Ab* e *cry2Ab* (13 estirpes), *cry1Aa* e *cry2Aa* (9), *cry1Ad* e *cry1E* (6) e *cry1Ac* (5). Três estirpes expressaram amplicons

correspondentes aos genes *cry1F* e *cry1G*, enquanto amplicons para os genes *cry1B*, *cry1C* e *cry1D* foram detectados apenas uma vez (tabela 6). A variabilidade de genes detectados nas estirpes propicia uma expansão do espectro de hospedeiros da bactéria (AGAISSE & LERECLUS, 1995).

As estirpes S602 e S1258 apresentaram perfil gênico e protéico semelhantes entre si, ou seja, proteína de 130 kDa, correspondente aos genes *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac* e proteína de 65 kDa, que corresponde aos genes *cry2Aa* e *cry2Ab*. Já a estirpe S1264 apresentou os mesmos genes, mas não apresentou no perfil protéico a proteína de 65 kDa. É possível que esta proteína não esteja sendo expressa ou esteja sendo expressa em baixas quantidades indetectáveis nas preparações. Todas as outras combinações gênicas foram diferentes entre si.

As estirpes mais tóxicas, S602, S1264 e S1301, apresentaram em comum a presença dos genes *cry1Ab*, *cry1Ac* e *cry2Aa* (Tabela 6). Hernández *et al.*, (2008) constataram que as estirpes de Bt, utilizadas em muitos inseticidas biológicos, que expressam estes genes, apresentam toxicidade a lepidópteros. Resultados semelhantes foram encontrados por Gitahy *et al.*, (2007), que demonstraram que a estirpe S76 e a HD-1 (padrão) são similares e expressam genes do tipo *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac* e *cry2Aa*, *cry2Ab*. Outros estudos corroboram os resultados encontrados no presente trabalho, como demonstrado por Praça *et al.*, (2004) que demonstrou que duas estirpes de *B. thuringiensis* (S234 e S997) são tóxicas a larvas de *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith e *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae), *Aedes aegypti* Linnaeus e *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) apresentam genes do tipo *cry1* e *cry2*.

Frankenhuyzen *et al.*, (2009) testou a especificidade das toxinas Cry e Cyt em diversas ordens, observando que a *D. saccharalis* apresentou susceptibilidade às toxinas Cry1Aa e Cry1Ab. Em 2008, Sivasupramaniam *et al.*, testaram a proteína Cry1Ac no controle de cinco lepidópteros e observaram que esta proteína foi mais tóxica para *Heliothis virescens* e *Pectinophora gossypiella*, apresentava uma boa atividade contra *Helicoverpa zea*, e pouca toxicidade contra *Spodoptera exigua* e *Spodoptera frugiperda*, apresentando diferentes níveis de toxicidade em diversos insetos de uma mesma ordem.

Tabela 6 - Perfis protéicos e conteúdo gênico presentes nas estirpes de *Bacillus thuringiensis*.

Estirpes	Conteúdo gênico	Perfil protéico (kDa)
S602	<i>cryIAa, cryIAb, cryIAc, cry2Aa, cry2Ab</i>	130 – 65
S1258	<i>cryIAa, cryIAb, cryIAc, cry2Aa, cry2Ab</i>	130 – 65
S1264	<i>cryIAa, cryIAb, cryIAc, cry2Aa</i>	130
S1287	<i>cryIAb, cryIAd, cryIF, cryIG</i>	130
S1289	<i>cryIAb, cryIAd, cry2Ab</i>	130 – 65
S1295	<i>cryIAa, cryIAb, cryIAd, cryIC, cryIE, cry2Ab</i>	65
S1298	<i>cryIF, cryIG, cry2Ab</i>	130 – 65
S1301	<i>cryIAb, cryIF, cryIAc, cryID, cryIG, cry2Aa, cry2Ab</i>	130
S1303	<i>cryIAb, cryIE, cry2Aa</i>	130 – 65
S1304	<i>cryIAb, cryIE, cry2Aa, cry2Ab</i>	130 – 65
S1307	<i>cryIAa, cryIAb, cryIB, cryIE, cry2Aa, cry2Ab</i>	130 – 65
S1664	<i>cryIAa, cry2Ab</i>	130
S1979	<i>cryIAa, cryIAb, cryIAc, cryIAd, cry2Aa, cry2Ab</i>	130 – 65
S2021	<i>cryIAa, cryIAd, cry2Ab</i>	130
S2193	<i>cryIAa, cryIAb, cryIE, cryIF, cry2Ab</i>	130
S2195	<i>cryIAb, cryIAd, cryIE, cry2Aa, cry2Ab</i>	130 – 65
S1450 (Btk)	<i>cryIAa, cryIAb, cryIAc, cry2Aa, cryIB</i>	130 – 65

### 3.4 - Bioensaios utilizando proteínas Cry individuais

Das seis estirpes recombinantes de *B. thuringiensis* expressando as toxinas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1B, Cry1I e Cry2A apenas quatro (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2A) causaram mortalidade. Diversas toxinas têm sido descritas como tóxicas para a ordem Lepidoptera: Cry1Aa para *M.sexta*, *B. mori*, *H. virescens*, *S. exigua*, *O. nubilali*, e *T. pityocampa* (KWA *et al.*, 1998; HERBERT *et al.*, 2006; VAN FRANKENHUYZEN, 2009); Cry1Ab para *T. pityocampa*, *E. insulana* e *C. suppralis* (RAUSELL *et al.*, 2000; FIUZA *et al.*, 1996, IBARGUTXI *et al.*, 2005; SHARMA *et al.*, 2011); Cry1Ac para *T. solanivora*, *L. díspar* e *B. mori*, (MARTÍNEZ *et al.*, 2003; PIGOTT & ELLAR, 2007; PANDIAN *et al.*, 2008) e Cry2Aa para *P. xylostella* e *H. virescens* (MONNERAT *et al.*, 1999; SCHNEPF *et al.* 1998; GAHAN *et al.*, 2005).

A CL<sub>50</sub> das proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa variou entre 222 e 610 ng/cm<sup>2</sup> (tabela 7). Ainda que as toxinas Cry1Ab e Cry2Aa tenham apresentado os resultados de CL<sub>50</sub> mais baixos (222 e 278 ng/cm<sup>2</sup>), todas as proteínas apresentaram resultados de toxicidade significativamente semelhantes, pois os valores do intervalo de confiança se sobrepõem.

É importante notar que as estirpes tóxicas selecionadas nesse trabalho e o padrão apresentaram CL<sub>50</sub> de 8 a 43 ng/cm<sup>2</sup> (Tabela 5) bastante inferior e significativamente diferente do das toxinas puras, indicando haver sinergismo entre as toxinas. Outros autores relataram que a toxicidade das proteínas Cry pode estar relacionada com a ação sinérgica existente em algumas estirpes, ou seja, a ação se torna potencializada quando duas ou mais proteínas Cry agem em conjunto, portanto torna-se necessário realizar e analisar bioensaios com proteínas individuais e em conjunto para confirmar a toxina responsável pela mortalidade (SCHNEPF *et al.*, 1998, PRAÇA *et al.*, 2004).

Tabela 7 – CL<sub>50</sub> das toxinas Cry avaliadas separadamente e intervalo de confiança a 95% do bioensaio de dose das proteínas Cry de *B. thuringiensis* tóxicas à *D. saccharalis*.

<b>Toxinas puras</b>	<b>CL<sub>50</sub> (ng/cm<sup>2</sup>)</b>	
Cry1Aa (S2211)	610.75 (364.76 – 1037.10)	a
Cry1Ab (S2010)	222.5 (50.58 – 681.10)	a
Cry1Ac (S2009)	327.56 (186.90 – 615.83)	a
Cry2Aa (S2212)	278.28 (136.32 – 533.25)	a

- os números entre parêntesis correspondem ao intervalo de confiança a 95%.

- (a) agrupamento estatístico, com base no intervalo de confiança a 95%, das toxinas testadas.

A ocorrência da susceptibilidade de diferentes toxinas de Bt tem sido demonstrada por inúmeras outras pragas de insetos, incluindo outras espécies do gênero *Diatraea* (VAN FRANKENHUYZEN *et al.*, 2009). Van Frankenhuyzen *et al.*, (2009) testaram a especificidade das toxinas Cry e Cyt em diversas ordens de insetos, observando que *D. saccharalis* apresentou susceptibilidade às toxinas Cry1Aa e Cry1Ab.

Rausel *et al.*, (2000) demonstraram que durante o desenvolvimento larval a toxicidade de Cry1Ab e Cry1Ac decresce com o aumento da idade das larvas evidenciando a existência de isolados potenciais para serem utilizados no controle biológico desta praga nos primeiros estágios larvais.



### 3.5 - Ativação com tripsina e proteases

A ativação das proteínas está inteiramente ligada ao mecanismo de ação da toxina Cry. A ação das proteases intestinais é de fundamental importância para ocorrer a liberação dos fragmentos tóxicos pelas protoxinas. A interação da toxina ativa com os possíveis receptores de membrana depende da conformação em que as duas estruturas se encontram. Para simulação e observação da ação das enzimas envolvidas no processo de ativação, foi utilizada tripsina sintética e proteases extraídas do suco gástrico, presentes no intestino médio do inseto.

Bravo *et al.*, (2007) e Hofte & Whiteley (1989) descrevem que as proteínas tornam-se ativas com massa molecular de 65 kDa, aproximadamente, resultado semelhante das proteínas ativas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa, foi encontrado neste trabalho como demonstrado na figura 5 A e B, justificando que a tripsina faz parte da classe de proteases do tipo serínica, uma das principais enzimas digestivas, responsável pela clivagem da toxina das larvas de insetos da ordem lepidóptera, a qual faz parte *D. saccharalis* (TERRA *et al.*, 1996; GARCIA *et al.*, 2004).

A síntese de cristais de proteína composto por moléculas de protoxina de 130-140 kDa (BRAVO *et al.*, 2007), são as principais responsáveis pelo efeito letal que, após a ingestão por larvas de espécies sensíveis são dissolvidos pelo fluido alcalino presente no intestino médio e processada proteoliticamente para uma toxina ativa de 60 kDa (SAADAOUI *et al.*, 2009). A visualização de outras bandas na ativação da proteína Cry1Aa e Cry2Aa com proteases intestinais podem estar relacionada com a degradação da proteína pela presença de outras proteases no suco intestinal das lagartas. Outros fatores que podem ser responsáveis por esse tipo de perfil protéico são o tempo de incubação da proteína com as proteases, a proporção entre concentração das proteínas Cry1Aa e Cry2Aa, e a concentração das proteases.

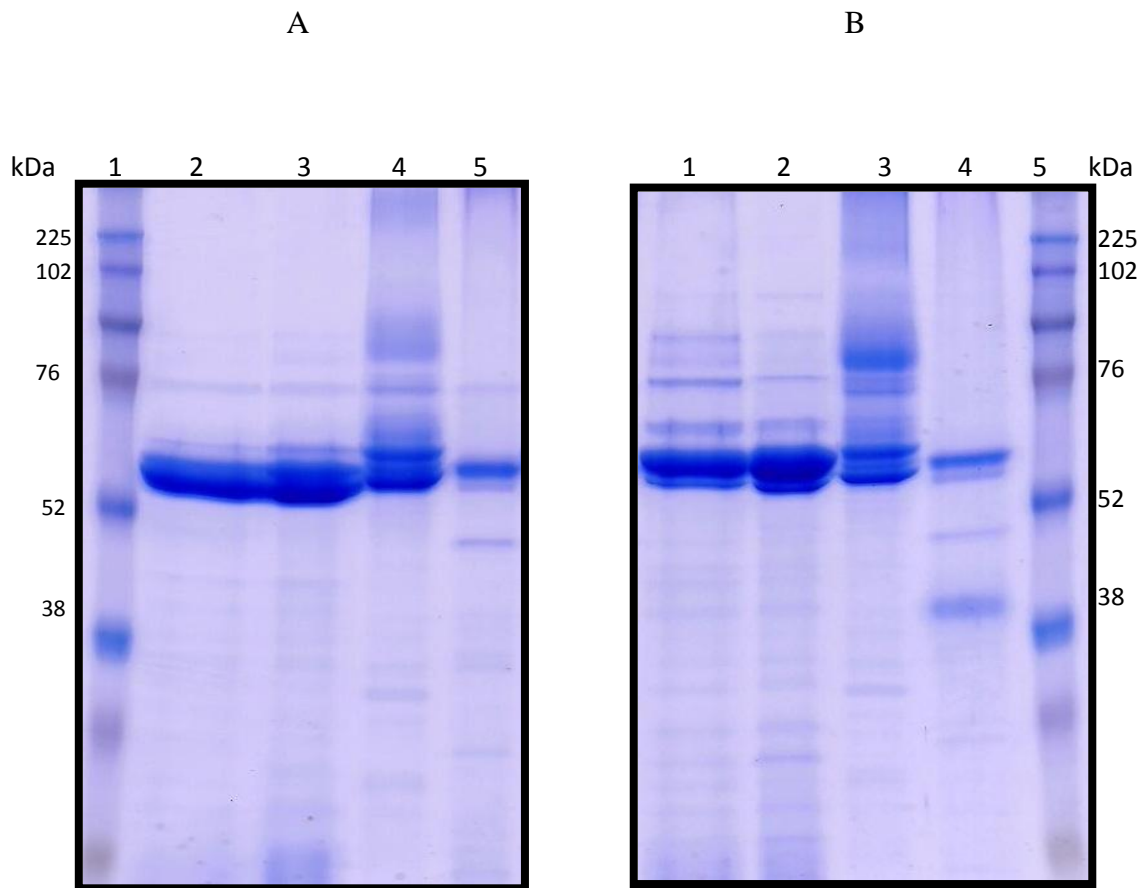


Figura 5- **A:** Ativação das proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa com tripsina (SDS-PAGE a 12%). 1: marcador de massa molecular Rainbow da GE, 2: proteína Cry1Aa ativada, 3: proteína Cry1Ab ativada, 4: proteína Cry1Ac ativada e 5: proteína Cry2Aa ativada. **B:** Ativação das proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa com protease (SDS-PAGE a 12%). 1: proteína Cry1Aa ativada com protease, 2: proteína Cry1Ab ativada com protease, 3: proteína Cry1Ac ativada com protease, 4: proteína Cry2Aa ativada com protease e 5: marcador de massa molecular Rainbow da GE.

### 3.6 - Biotinilação das proteínas Cry

A análise das proteínas ativadas e biotiniladas mostrou a presença de uma banda principal de aproximadamente, 65 kDa, para as proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa (figura 6). Este resultado confirma a integridade das proteínas e que o tamanho esperado das proteínas está de acordo com trabalhos desenvolvidos por HOFTE & WHITELEY (1989) e BRAVO *et al.*, (2007). O conjugado estreptavidina-peroxidase que atua como marcador de proteínas é muito utilizado para aumentar a sensibilidade de uma variedade de ensaios imunocitoquímicos e moleculares (KITIGUL *et al.*, 1998; ZHOU *et al.*, 2001).

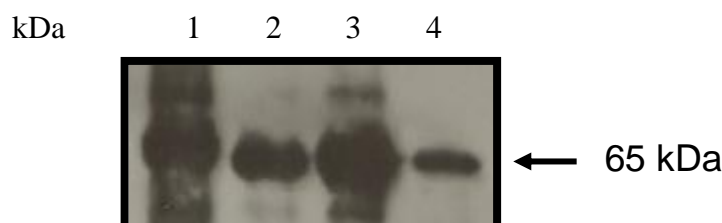


Figura 6 - Biotinilação das proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa (SDSPAGE a 12%). 1: marcador Biotinylated High range (BioRad); 2: proteína Cry1Aa ativada e biotinilada, 3: proteína Cry1Ab ativada e biotinilada, 4: Proteína Cry1Ac ativada e biotinilada e 5: proteína Cry2Aa ativada e biotinilada.

### 3.7 Ensaio de ligação das toxinas Cry aos receptores de membrana intestinais (BBMV's)

Uma vez detectada a atividade tóxica das proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa para *D. saccharalis*, foi analisada sua capacidade de ligação ao intestino médio das larvas de *D. saccharalis*. Ensaios de ligação utilizando proteínas da membrana intestinal de insetos são comumente utilizados no estudo da interação entre as toxinas produzidas pelo *B. thuringiensis* e seus receptores, por serem os principais responsáveis

pela especificidade de cada toxina Cry (HERNÁNDEZ *et al.*, 2004; PIGOTT & ELLAR *et al.*, 2007).

As membranas contendo as BBMV's de *D. saccharalis* apresentaram ligações quando submetidas à marcação das proteínas biotinizadas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa. A presença do sinal significa que ocorreu a ligação entre as proteínas Cry e os receptores presentes na superfície do intestino médio da lagarta da *D. saccharalis*. Todas as proteínas solúveis ligaram-se aos possíveis receptores presentes no intestino médio das lagartas (figura 7). Este tipo de interação depende da conformação em que as duas estruturas se encontram. Segundo LÓPEZ-PAZOS *et al.*, (2009) as toxinas Cry1 e Cry2 se ligam a receptores específicos nas microvilosidades de células epiteliais do inseto alvo.

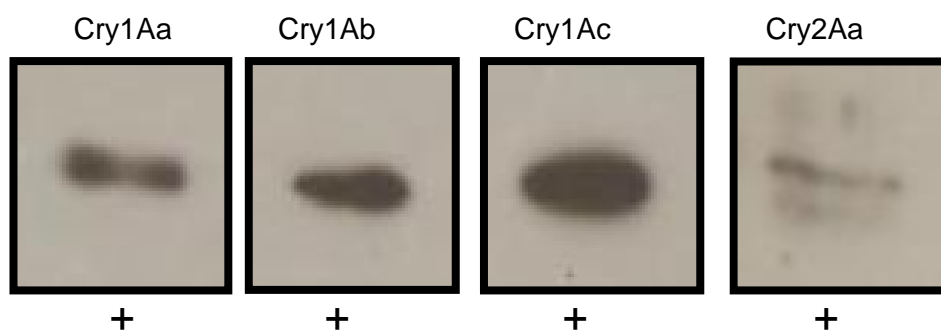


Figura 7 - Proteínas ativadas e biotinizadas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa aos receptores intestinais da *Diatraea saccharalis*. Os sinais positivos indicam a ligação das proteínas aos receptores.

Nas ligações obtidas com as proteínas e os receptores intestinais, ficaram evidentes as variações da intensidade de marcação. Este tipo de interação pode estar relacionada à conformação em que as duas estruturas se encontram. Diferentes toxinas Cry podem compartilhar o mesmo receptor, ou podem se ligar a diferentes receptores presentes na membrana intestinal do inseto. Aminopeptidases e caderinas têm sido bem relatadas como possíveis receptores das toxinas Cry em lepidópteros (HARA *et al.*, 2003; HERNÁNDEZ *et al.*, 2004).

A variação da susceptibilidade das toxinas de Bt tem sido muito bem descrita em populações de *P. xylostella* (GONZÁLEZ-CABRECA *et al.*, 2001). Além disso,

proteínas entre 65 e 71 kD, como Cry2Aa e Cry2Ac apresentam toxicidade para lepidópteros e dípteros, enquanto que Cry2Ab possui atividade somente para lepidópteros (BRAVO *et al.*, 2004; SAUKA *et al.*, 2005; ZHANG *et al.*, 2007). Vários estudos demonstram que as proteínas Cry2Aa não possuem os mesmos receptores das proteínas Cry1Aa para alguns lepidópteros (KARIM & DEAM, 2000; KARIM *et al.*, 2000).

Este estudo comprovou que as proteínas testadas se ligaram aos receptores de membrana do intestino médio das larvas de *D. saccharalis* demonstrando a ação tóxica destas proteínas contra este inseto. Estudos que demonstram a interação de BBMV's de insetos com as toxinas Cry são essenciais para o entendimento de mecanismo de ação e descrição dos receptores em diversas ordens.

#### 4. CONCLUSÕES

Dois tipos de protocolos foram estabelecidos neste trabalho, com a finalidade de verificar o efeito tóxico do *B. thuringiensis* à broca-da-cana. Das 106 estirpes testadas, 16 causaram 100% de mortalidade. As estirpes S602, S1264 e S1301 causaram percentual de mortalidade de 75% no bioensaio com a cultura bacteriana diluída em 50 vezes.

A toxicidade da estirpe S602 foi semelhante, estatisticamente, a das estirpes S1264 e do padrão Btk, diferente, entretanto, da S1301. A toxicidade de S1264, S1301 e Btk foram também semelhantes entre si. As estirpes pertencentes aos sorotipos *aizawai*, *kurstaki*, *gallerie* e *morrisoni* foram tóxicas à *D. saccharalis*.

A análise molecular por PCR mostrou que nas estirpes S602, S1264 e S1301 foram encontrados os genes *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry2Aa* e *cry2Ab*. Apresentaram em comum a presença dos genes *cry1Ab*, *cry1Ac* e *cry2Aa*. As estirpes testadas apresentaram duas proteínas principais de 130 e 65 kDa descritos na literatura como tóxicos a Lepidópteros.

Os resultados obtidos nos bioensaios evidenciaram que todas as proteínas testadas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa apresentaram toxicidade a larvas de *D. saccharalis*. Os valores da  $CL_{50}$  variou entre 222 e 610 ng/cm<sup>2</sup>, apresentando resultados de toxicidade significativamente semelhantes, pois os valores do intervalo de confiança se sobrepõem. As estirpes tóxicas selecionadas nesse trabalho e o padrão apresentaram  $CL_{50}$  de 8 a 43 ng/cm<sup>2</sup> bastante inferior e significativamente diferente do das toxinas puras, indicando haver sinergismo entre as toxinas.

A ativação das proteínas com tripsina e proteases foi demonstrada através do gel de poliacrilamida mostrando perfil de ativação significativamente semelhantes, com a identificação de bandas protéicas com massa molecular de aproximadamente 65 kDa, mostrando que foram clivadas por tripsina e proteases do suco gástrico da maneira esperada.

Os resultados obtidos no ensaio de ligação com as membranas contendo as BBMV's dos insetos de *D. saccharalis* demonstraram ligações quando submetidas a marcação com biotina das proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa. Estes resultados contribuem na confirmação da atividade tóxica destas proteínas aos possíveis receptores presentes no intestino médio das lagartas.

Através dos resultados obtidos, foi possível selecionar dentre as 106 estirpes subespécies testadas, 16 que apresentaram índice de mortalidade considerável contra o inseto-alvo do trabalho, *D. saccharalis*. Assim este trabalho contribui para a produção de bioinseticidas sistêmicos mais específicos para a broca-da-cana-de-açúcar.

## 5. PERSPECTIVAS

- Identificar os possíveis receptores das proteínas de *B. thuringiensis* para *D. saccharalis*.
- Realizar ensaios de competição heteróloga com as proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa ativadas pelas proteases de *D. saccharalis*.
- Determinar o grau de sinergismo das proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa para *D. saccharalis* a partir de novos bioensaios.
- Selecionar três estirpes tóxicas de *B. thuringiensis* e aptas a colonizar endofiticamente a cana-de-açúcar, para determinação do mecanismo de translocação do *B. thuringiensis* na cana-de-açúcar.



## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGAISSE, H. & LERECLUS, D. How does *Bacillus thuringiensis* produces so much insecticidal crystal protein? **Journal of Bacteriology**, v. 177, p. 6027-6032, 1995.

ARONSON, A. I.; BECKMAN, W.; DUNN, P. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. **Microbiology Review**, v. 50, p. 1-24. 1986.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v. 8, p. 93-99. 1987.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities protein utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**. v. 72, p. 248-254. 1976.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Agrofit: sistemas de agrotóxicos fitossanitários. Disponível em: [http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons) Acesso em: 13 out. 2011.

BOTELHO, P.S., MACEDO, N. *Cotesia flavipes* para o controle de *Diatraea saccharalis*. In: PARRA, J.R.P., BOTELHO, P.S.M., CORRÊA-FERREIRA, B.S., BENTO, J.M. (Eds). **Controle biológico no Brasil**, p. 409-21, 2002.

BRAVO, A.; SARABIA, S.; LOPEZ, L.; ONTIVEROS, H.; ABARCA, C.; ORTIZ, M.; LINA, L.; VILLA-LOBOS, F. J.; NUÑEZ-VALDEZ, M.E.; SOBERÓN, M.; QUINTERO, R. Characterization of *cry* genes in Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 12, p. 4965-4972, 1998.

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

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

CRUZ, I. A Broca da Cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis*, em Milho, no Brasil. **Circular técnica**, 90. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento. EMBRAPA. v. 12, p. 1679-1150, 2007.

FINNEY, D.J. **Probit analysis**. Cambridge, England: Cambridge University Press, 31 p. 1971.

FIUZA, L.M. et al. Binding of *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxins to the midgut brush border membrane vesicles of *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidea): evidence of shared binding sites. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 5, p. 1544-1549, 1996.

FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION. [S.l.], 2009. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/default.aspx>>. Acesso em: 10 janeiro 2011.

GAHAN, L.J.; MA, Y.T.; COBLE, M.L.; GOULD, F.; MOAR, W.J. Genetic basis of resistance to Cry1Ac and Cry2Aa in *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal Economy Entomology**, v. 98, p. 1357–1368, 2005.

GARCIA, V. A.; FREIRE, M. G. M.; NOVELLO, J. C.; MARANGONI, S.; MACEDO M. L. R. Trypsin Inhibitor from *Poecilanthe parviflora*. Seeds: Purification, characterization, and activity against pest proteases. **The Protein Journal**, v. 23, p. 343-350, 2004.

GUAGLIUMI, P. **Pragas da cana-de-açúcar no nordeste do Brasil**. Rio de Janeiro: Instituto do Açúcar e do Alcool. Col. Canav. p. 622, 1973.

GUERCHICOFF A.; DELÉCLUSE, A.; RUBINSTEIN, C. P. The *Bacillus thuringiensis* cyt genes for hemolytic endotoxins constitute a gene family. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 3, p. 1090–1096, 2001.

HARA, H., ATSUMI, S., YAOI, K., NAKANISHI, K., HIGURASHI, S., MIURA, N., TABUNOKI, H., SATO, R. A cadherin-like protein functions as a receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa and Cry1Ac toxins on midgut epithelial cells of *Bombyx mori* larvae. **FEBS Letters**, v. 538, p. 29–34, 2003.

HERBERT, A. A.; SIQUEIRA, H. A. A.; GONZÁLEZ-CABRERA, J.; FERRÉ, J.; FLANNAGAN, R.; SIEGFRIED, B. D. Analyses of cry1ab binding in resistant and susceptible strains of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (hübner) (Lepidoptera: Crambidae). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n° 8, p. 5318–5324., 2006.

HERNÁNDEZ, C. S.; RODRIGO, A.; FERRÉ, J. Lyophilization of lepidopteran midguts: a preserving method for *Bacillus thuringiensis* toxin binding studies. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 85, p. 182–187, 2004.

HOFTE, H. & WHITELEY, H. R. Insecticidal crystal protein of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiology Review**, v. 53, p. 242-255, 1989.

HÖFTE , H.; RIE, J. van; JANSSENS, S.; HOUTVEN, A. van; VANDERBRUGGEN, H.; VAECK, M. Monoclonal antibody analysis and insecticidal spectrum of three types of lepidopteran-specific insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, p. 2010-2017, 1988.

IBARRA, J. E.; RINCÓN, M. C.; ORDÚZ, S.; NORIEGA, D.; BENNINTENE, G.; MONNERAT, R.; REGIS, L.; OLIVEI in RA, C. M. F.; LANZ, H.; RODRIGUEZ, M. H.; SÁNCHEZ, S.; PEÑA , G.; BRAVO, A. Diversity of *Bacillus thuringiensis* Stains from Latin America with Inseticidal Activity against Different Mosquito Species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 5269-5274, 2003.

IBARGUTXI, M. A. ESTELA, A.; FERRE, J.; CABALLERO, P. Use of *Bacillus thuringiensis* Toxins for Control of the Cotton Pest *Earias insulana* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 1, p. 437–442, 2006.

GONZÁLEZ-CABRERA, J.; ESCRICHE, B.; TABASHNIK, B. E.; FERRÉ J. Binding of *Bacillus thuringiensis* toxins in resistant and susceptible strains of pink bollworm (*Pectinophora gossypiella*). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 33, p. 929–935, 2003.

KARIM, S. & DEAN, D.H. Toxicity and receptor binding properties of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins to the midgut brush border membrane vesicles of the rice leaf folders, *Cnaphalocrocis medinalis* and *Marasmia patnalis*. **Current Microbiology**, v. 41, p. 276-283, 2000.

KARIM, S.; RIAZUDDIN, S.; GOULD, F.; DEAN, D.H. Determination of receptor binding properties of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins to cotton bollworm (*Helicoverpa zea*) and pink bollworm (*Pectinophora gossypiella*) midgut brush border membrane vesicles. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 67, p. 198-216, 2000.

KING, E.G. & HARTLEY, G.G. *Diatraea saccharalis*. In P. Singh & R.F. Moore (eds.). Handbook of insect rearing. **Elsevier**, p. 265-270, 1985.

KITTIGUL, L.; SUTHACHANA, S.; KITTIGUL, C.; PENGUANGROJANACHAI, V. Immunoglobulin M-capture Biotin-Streptavidin Enzyme-Linked Immunosorbent assay for detection of antibodies to dengue viruses. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, v. 59, n. 3, p. 352-356, 1998.

KWA, M. S. G.; MAAGD, R. A.; STIEKEMA, W. J.; VLAK,† J. M.; BOSCH, D. Toxicity and Binding Properties of the *Bacillus thuringiensis* Delta-Endotoxin Cry1C to Cultured Insect Cells. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 71, p. 121–127, 1998.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LECADET, M. M.; CHAUF AUX, J.; RIBIER, J.E.; LERECLUS, D. Construction of novel *Bacillus thuringiensis* strains with different insecticidal activities by transduction and transformation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 840-849, 1991.

LERECLUS, D.; AGAISSE, H.; GOMITED, M.; CHAUF AUX, J. Overproduction of encapsulated insecticidal crystal proteins in a *Bacillus thuringiensis* spoOA mutant. **Bio/Technology**, v. 13, p. 67-71, 1995.

LEVINSON, B. L.; KASYAN, K. J.; CHIU S.S.; CURRIER, S.; GONZÁLEZ, JR. J. M. Identification of  $\beta$ - exotoxin production plasmids encoding  $\beta$ - exotoxin, and a new exotoxin in *Bacillus thuringiensis* by using high-performance liquid chromatography. **Journal of Bacteriology**, v. 172, p. 3172-3179. 1990.

LÓPEZ-PAZOS, S. A.; ARIAS, A. C. R.; OSPINA, S. A.; CERÓN, J. Activity of *Bacillus thuringiensis* hybrid protein against a lepidopteran and a coleopteran pest. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia. **Microbiology Letters**, v. 302(2), p. 93-8, 2010.

MARTÍNEZ, W; URIBE D. & CERÓN J. Efecto tóxico de proteínas Cry1 de *Bacillus thuringiensis* sobre larvas de *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae). **Revista Colombiana de Entomología**, v. 29, p. 89-93. 2003.

MONNERAT, R.; MASSON L.; BROUSSEAU, R.; PUSZTAI-CAREY, M.; BORDAT, D.; FRUTOS, R. Differential activity and activation of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins in diamondback moth, *Plutella xylostella*. **Current Microbiology**, v. 39, p. 159-162, 1999.

MONNERAT, R. G.; Identificação, caracterização e disponibilização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* eficazes ao controle de lepidópteros desfoliadores da cultura do algodão. **Embrapa Cenargen**. Relatório Final Facual. Brasília, 2003.

MONNERAT, R. G.; BATISTA, A. C.; MEDEIROS, P.; MARTINS, É.; MELATTI, V. M.; PRAÇA, L. Screening of Brazilian *Bacillus thuringiensis* isolates active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatilis*. **Biological Control**, v. 41, p. 291-295, 2007.

PANDIAN, N.G.; ISHIKAWA, T.; TOGASHI, M.; SHITOMI, Y.; HAGINOYA, K.; YAMAMOTO, K.; NISHIUMI, T.; HORI, H. *Bombyx mori* midgut membrane protein P252 which binds to Cry1A of *Bacillus thuringiensis* is a chlorophyllide binding protein and its resulting complex has antimicrobial activity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p. 1324-1331, 2008.

PENG, D.; XU, X.; RUAN, L. YU, Z. SUN, M. Enhancing Cry1Ac toxicity by expression of the *Helicoverpa armigera* cadherin fragment in *Bacillus thuringiensis*. **Research in Microbiology**, v. 161, p. 383-389, 2010.

PRAÇA, L. B.; BATISTA, A. C.; MARTINS, É. S.; SIQUEIRA, C. B.; DIAS, D. G. S.; GOMES, A. C. M. M.; FALCÃO, R.; MONNERAT, R. G. Estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Díptera. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, p.11-16, 2004.

RAMOS, F.; CARMONA, A.; BÈRES, M.; MÉNDEZ, N. Evaluación de Aislamentos de *Bacillus thuringiensis* tóxicos à *Diatraea saccharalis* (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE). **Bioagro**, v. 16, n. 3, 6 p., 2004.

RAUSELL, C.; MARTÍNEZ-RAMÍREZ, A. C.; GARCÍA-ROBLES, I.; REAL, M. D. A binding site for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin is lost during larval development in two forest pests. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 66. p. 1553–1558, 2000.

ROSAS-GARCÍA, N. M. Laboratory and field tests of spraydried and granular formulations of a *Bacillus thuringiensis* strain with insecticidal activity against the sugarcane borer. **Pest Management Science**, v. 62: p. 855-61, 2006.

SAADAoui, I; ROUIS, S.; JAOUA, S. A new Tunisian strain of *Bacillus thuringiensis* kurstaki having high insecticidal activity and-endotoxin yield. **Archives of Microbiology**, v. 191, p. 341–348, 2009.

SARAIVA, M., PRAÇA, L. B., FALCÃO, R., MONNERAT, R. Isolamento de novas estirpes de *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus sphaericus* para o controle de *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti*. **Comunicado técnico 164**. Embrapa. Brasília, DF. 2007.

SAUKA, D. H., COZZI, J. G.; . BENINTENDE, G. B. Screening of *cry2* genes in *Bacillus thuringiensis* isolates from Argentina. **Short communication**, v. 88, n. 2, p. 163-165, 2005.

SHARMA, P.; NAIN, V.; LAKHANPAUL, S.; KUMAR, P.A.; Binding of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins with brush border membrane vesicles of maize stem borer (*Chilo partellus* Swinhoe). **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 106, p. 333-335, 2011.

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

SIVASUPRAMANIAM, S.; MOAR, W.J.; RUSCHKE, L.G.; OSBORN, J.A.; JIANG, C.; SEBAUGH, J.L.; BROWN, G.R.; SHAPPLEY, Z.W.; OPPENHUIZEN, M.E.; MULLINS, J.W.; GREENPLATE, J.T. Toxicity and characterization of cotton expressing *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac and Cry2Ab2 proteins for control of lepidopteran pests. **Journal of Economic Entomology**. 101(2):546-54, 2008.

SILVA-WERNECK, J. O.; & ELLAR, D. J. Characterization of a novel Cry9Bb  $\delta$ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 98, p. 320-328, 2008.

TERRA, W. R., FERREIRA, C., JORDAO, B. P., AND DILLON, R. J. In: Lehane, M. J., and Billingsley, P. F. (eds.), *Digestive Enzymes: Biology of the Insect Midgut*, **Chapman and Hall**, p. 153–194, 1996.

THOMAS, W. E. & ELLAR, D. J. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* insecticidal delta-endotoxin. **FEBS Letters**: 154. p. 362–368, 1983.

VAN FRANKENHUYZEN, K. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. **Journal Invertebrate Pathology**. v. 101 (1), p. 1-16, 2009.

WEISER J. Impact of *Bacillus thuringiensis* on applied entomology in eastern Europe and in Soviet Union. In: Krieg A., Huger A. M., **Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem Heft**, v. p. 233, 37-50, 1986.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **\*Report of an informal consultation on the detection, isolation, identification and ecology of bio control agents of disease vectors\***. Who Mimeograph Document, v. 87.3, 1987

WOLFERSBERGER, M.G.; LUETHY, P.; MAURER, P.; PARENTI, P.; SACCHI, V.F.; GIORDANA, B.; HANOZET, G.M. Preparation and partial characterization of amino acid transporting brush border membrane vesicles from the larval midgut of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 86A, p. 301–308, 1987.

YU, C-G.; MULLINS, M. A.; WARREN, G. W.; KOZIEL, M. G.; ESTRUCH, J.J. The *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A lyses midgut epithelium cells of susceptible insects. **Applied and Environmental Microbiology**: 63, p. 532-536, 1997.



YU, X.; LIU, T.; LIANG, X.; TANG, C.; JUN, Z.; WANG, S.; LI, S.; DENG, Q.; WANG, L.; ZENG, A. & LI, P. Rapid detection of vip1-type genes from *Bacillus cereus* and characterization of a novel vip binary toxin gene. **FEMS Microbiol Letters**, v. 325, p. 30–36, 2011.

ZHANG, L.L.; LIN J.; LU, O.S.L.; GUAN C.Y.; ZHANG, Q.L.; GUAN, Y.; ZHANG, Y.; JI, J.T.; HUANG, Z.P.; GUAN, X. A novel *Bacillus thuringiensis* strain LLB6, isolated from bryophytes, and its new cry2Ac-type gene. **Letters in Applied Microbiology**, v. 44, p. 301–307, 2007.

ZHOU, E. M.; RIDD, D.; RIVA, J.; FERNANDO, L.; CLAVIJO, A.. Development and evaluation of na IgM-capture ELISA for detection of recent infection with bluetongue viruses in cattle. **Journal of Virological Methods**, v. 91, n. 2, p. 175-182, 2001.