



ADELAIDE FERREIRA MARSIGLIO

**CARACTERIZAÇÃO DE GENES CODIFICADORES
DE ENTOMOTOXINAS DE
Photorhabdus luminescens subsp. *akhurstii*.**

Tese apresentada ao programa de Pós-
Graduação Interunidades em
Biotecnologia ICB/USP para a
obtenção de título de Doutor em
Biotecnologia.

São Paulo

2007



ADELAIDE FERREIRA MARSIGLIO

CARACTERIZAÇÃO DE GENES CODIFICADORES
DE ENTOMOTOXINAS DE

Photorhabdus luminescens subsp. *akhurstii*.

Tese apresentada ao programa de Pós-
Graduação Interunidades em
Biotecnologia ICB/USP para a
obtenção de título de Doutor em
Biotecnologia.

São Paulo

2007

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
Instituto de Física de Carlos de Faria, Instituto de Física de São Carlos, Instituto de Física de Roraima, Instituto de Física de Teresopolis

CARACTERIZAÇÃO DE GENES CODIFICADORES DE ENTOMOTOXINAS DE

Photorhabdus luminescens subsp. *akhurstii*.

ADELAIDE FERREIRA MARSIGLIO

Bióloga

Orientador Dr. Itamar Soares de Melo

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia ICB/USP para a obtenção de título de Doutor em Biotecnologia.

São Paulo

Fevereiro – 2007



DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

T-ICB
BIOT Marsiglio, Adelaide Ferreira.
QH323.6 Caracterização de genes codificadores de entomotoxinas de
M372cg *Photorhabdus luminescens* subsp. *akhurstii* / Adelaide Ferreira
2007 Marsiglio. -- São Paulo, 2006.

Orientador: Itamar Soares de Melo

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT. Área de concentração Biotecnologia. Linha de pesquisa: Entomotoxinas de *Photorhabdus luminescens*.

Versão do título para o inglês: Characterization of entomotoxins genes of *Photorhabdus luminescens* subsp. *akhurstii*.

Descritores: 1. *Photorhabdus luminescens* 2. Entomotoxinas 3. Genes tc 4. *Diatraea saccharalis* 5. Simbionte de nematóides 6. *Heterorhabdilis* I. Melo, Itamar Soares de II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia III. Título.

ICB/SBIB001/2007

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Adelaide Ferreira Marsiglio.


Título da Tese: Caracterização de genes codificadores de entomotoxinas de *Photobacterium luminescens* subsp. *akhurstii*.

Orientador(a): Itamar Soares de Melo.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a 24 / 04 / 2007, considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura: 

Nome: Itamar Soares de Melo

Instituição: EMBRAPA

Examinador(a): Assinatura: 

Nome: Ricardo Horta

Instituição: Instituto Biológico

Examinador(a): Assinatura: 

Nome: Luis Carrigosa

Instituição: Instituto Biológico

Examinador(a): Assinatura: 

Nome: Helena Ramos Barbera

Instituição: I. C. B. / USP

Presidente: Assinatura: 

Nome: MARLI DE FATIMA FIORE

Instituição: CENA / USP

VIA DEDICATÓRIA

Aos meus pais Creso e Ana Eugênia, meus primeiros e melhores amigos.

Aos meus irmãos mais novos, meus companheiros de vida e grandes amigos.

Aos meus filhos mais queridos, meus herdeiros e amigos.

Aos meus amigos, meus companheiros de vida e grandes amigos.

Aos meus colegas de trabalho, meus parceiros de vida e grandes amigos.

Aos meus amigos de infância, meus parceiros de vida e grandes amigos.

Aos meus amigos de faculdade, meus parceiros de vida e grandes amigos.

Aos meus amigos de trabalho, meus parceiros de vida e grandes amigos.

Aos meus pais Creso e Ana Eugênia

Aos meus filhos Luisa e Rafael

Ao meu marido Ricardo

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Itamar Soares de Melo pela oportunidade e confiança.

Ao Dr. Ricardo Harakava pela orientação valiosa, auxílio e grande amizade.

Aos meus pais pelo grande incentivo e apoio.

Ao meu marido e meus filhos pela paciência e incentivo.

Ao Dr. Luis Garrigós Leite do Instituto Biológico de Campinas pela contribuição e fornecimento de larvas de *Diatraea saccharalis* e *Galleria mellonella*.

Ao biólogo Heraldo Negri de Oliveira do Departamento de Entomologia da ESALQ/USP pela contribuição e fornecimento de larvas de *Diatraea saccharalis*.

Às pesquisadoras Dra. Sylvia Guzzo e MSc. Silvia Galetti do Instituto Biológico de São Paulo pelas sugestões, companheirismo e amizade.

Aos professores, funcionários e colegas do ICB/USP pela formação e auxílio.

RESUMO

CARACTERIZAÇÃO DE GENES CODIFICADORES DE ENTOMOTOXINAS DE *Photorhabdus luminescens* subsp. *akhurstii*.

Um isolado nativo da bactéria *Photorhabdus luminescens* (linhagem IB01) simbiote de nematóides do gênero *Heterorhabditis* foi identificada como *Photorhabdus luminescens* subsp. *akhurstii*. Através da comparação de genes *tccC* e *tcdA* da linhagem IB01 com os de outras já estudadas verificou-se a presença de genes semelhantes aos genes *tcdA1*, *tcdA2*, *tcdA3*, *tcdA4*, *tccC1*, *tccC2* e *tccC3* do isolado W14 de *P. luminescens* e *tccC6* do isolado TT01. Os genes *tcdA1* e *tcdA4* de IB01 foram clonados em *Escherichia coli* e totalmente seqüenciados. Foi construído um vetor para otimização da expressão do gene *tcdA1* em bactérias. Foi produzida uma biblioteca genômica e os cosmídeos contendo genes *tcdA* foram identificados. A toxicidade oral e injetável da linhagem IB01 e de clones de *E. coli* contendo genes da mesma foi testada contra larvas dos insetos *Galleria mellonella* L. e *Diatraea saccharalis* (Fabr.).

Palavras chave: *Photorhabdus luminescens*; entomotoxinas; genes *tc*; *Diatraea saccharalis*; simbiote de nematóides; *Heterorhabditis*.

ABSTRACT

LIFE IN BROWSE

CARACTERIZATION OF ENTOMOTOXIN GENES OF *Photorhabdus luminescens* subsp. *akhurstii*

A native isolate of the bacteria *Photorhabdus luminescens* (strain IB01) a symbiont of the nemathode *Heterorhabditis* was identified as *Photorhabdus luminescens* subsp. *akhurstii*. Comparison of the genes *tccC* e *tcdA* of strain IB01 to other strains already studied showed similarity with the genes *tcdA1*, *tcdA2*, *tcdA3*, *tcdA4*, *tccC1*, *tccC2* and *tccC3* of *P. luminescens* strain W14 and *tccC6* of strain TT01. Genes *tcdA1* e *tcdA4* of IB01 were cloned in *Escherichia coli* and completely sequenced. A vector to improve the expression of *tcdA1* gene in bacteria was developed. A genomic library was constructed and cosmids carrying *tcdA* genes were identified. Oral and injected toxicity of strain IB01 and *E. coli* clones carrying genes from this strain were tested against *Galleria mellonella* L. and *Diatraea saccharalis* (Fabr.) larvae.

Key words: *Photorhabdus luminescens*; entomotoxins; *tc* genes; *Diatraea saccharalis*; nemathode symbiont; *Heterorhabditis*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Desenho dos <i>primers</i> <i>tcdA</i> -F1 e <i>tcdA</i> -R1 baseado no alinhamento das seqüências nucleotídicas de genes <i>tcdA</i> de <i>P. luminescens</i> W14 e TT01.....	22
Figura 2 - Desenho dos <i>primers</i> <i>tccC</i> -F e <i>tccC</i> -R baseado no alinhamento das seqüências nucleotídicas de genes <i>tccC</i> de <i>P. luminescens</i> W14 e TT01.....	23
Figura 3 - Desenho dos <i>primers</i> <i>mcf</i> -F e <i>mcf</i> -R baseado no alinhamento das seqüências nucleotídicas de genes <i>mcf</i> de <i>P. luminescens</i> W14 e TT01.....	23
Figura 4 - Posição dos <i>primers</i> desenhados para a amplificação dos segmentos iniciais e finais dos genes <i>tcdA1</i> e <i>tcdA4</i>	26
Figura 5 - Etapas do processo de clonagem do gene <i>tcdA1</i> de <i>P. luminescens</i> IB01 junto à seqüência TIR no vetor pGEM-T Easy.....	31
Figura 6 - Mapa do cosmídeo pWEB-TNC (Epicentre Biotechnologies) utilizado para a construção de biblioteca genômica de <i>P. luminescens</i> linhagem IB01.....	33
Figura 7 - Alinhamento das seqüências nucleotídicas das extremidades 5' dos clones 09, 06 e 11, contendo genes <i>tcdA</i> de <i>P. luminescens</i> IB01, e seqüências de genes <i>tcdA</i> de <i>P. luminescens</i> W14.....	40
Figura 8 - Alinhamento das seqüências nucleotídicas das extremidades 3' dos clones 09, 06 e 11, contendo genes <i>tcdA</i> de <i>P. luminescens</i> IB01, e seqüências de genes <i>tcdA</i> de <i>P. luminescens</i> W14.....	41
Figura 9 - Eletroforese em gel de agarose 0,8 % dos genes <i>tcdA1</i> e <i>tcdA4</i> de <i>P. luminescens</i> IB01 amplificados por PCR utilizando a enzima Expand...	43
Figura 10 - Montagem da sub-biblioteca do clone <i>tcdA1</i> -18. As setas representam os insertos dos sub-clones seqüenciados.....	44
Figura 11 - Montagem da sub-biblioteca do clone <i>tcdA4</i> -1. As setas representam os insertos dos sub-clones seqüenciados.....	45
Figura 12 - Comparação entre as seqüências de aminoácidos da toxina TcdA1 dos isolados TT01, W14 e IB01 de <i>Photorhabdus luminescens</i>	47
Figura 13 - Segmento onde a proteína TcdA1-IB01 apresenta maior similaridade com a proteína TcdA4-W14.....	48

Figura 14 - Comparação entre as seqüências de aminoácidos da toxina TcdA4 dos isolados TT01, W14 e IB01 de <i>Photorhabdus luminescens</i>	50
Figura 15 - Segmento onde a proteína TcdA4-IB01 apresenta maior similaridade com a proteína TcdA2-W14.....	51
Figura 16 - Alinhamento das seqüências nucleotídicas de clones contendo genes <i>tccC</i> de <i>P. luminescens</i> IB01 e seqüências de genes <i>tccC</i> de <i>P. luminescens</i> linhagens W14 e TT01.....	54
Figura 17 - Alinhamento das seqüências nucleotídicas de clones contendo genes <i>mcf</i> de <i>P. luminescens</i> IB01 e seqüências de genes <i>mcf</i> de <i>P. luminescens</i> linhagens W14 e TT01.....	56
Figura 18 - Comparação entre as seqüências de aminoácidos de pks-IB01 e <i>P.luminescens</i> TT01.....	57
Figura 19 - Padrão de restrição com as enzimas <i>Bam</i> HI e <i>Hind</i> III dos cosmídeos IB01-01A07, IB01-02B04, IB01-02D08, IB01-01F02 e IB01-01D11.....	58
Figura 20 - Posição dos insertos dos cosmídeos IB01-02B04, IB01-01F02 e IB01-01D11 em relação à região contendo a ilha de patogenicidade de <i>P. luminescens</i> W14 (GenBank AF 346500).....	59
Figura 21 - Ganho de peso em relação ao peso inicial, por larva, de <i>G.mellonella</i> alimentadas com dieta artificial tratada com A - cultura de <i>P. luminescens</i> IB01, B - clone IB01-02B04, C - clone IB01-02D08, D - clone IB01-01D11, E - clone IB01-01F02, F - clone TIR-tcdA1 e G - <i>E. coli</i> não transformada (controle).....	60
Figura 22 - Aspecto de larvas de <i>G. mellonella</i> A - 24 horas após receber injeção de 5 µL do sobrenadante de cultura de <i>P. luminescens</i> IB01, B - 24 horas após receber injeção de 5 µL do sobrenadante de cultura de <i>E. coli</i> não transformada (controle).....	61
Figura 23 - Ganho de peso em relação ao peso inicial, por larva, de <i>D. saccharalis</i> alimentadas com dieta artificial tratada com A - cultura de <i>P. luminescens</i> IB01, B - clone IB01-02B04, C - clone IB01-02D08, D - clone IB01-01D11, E - clone IB01-01F02, F - clone TIR-tcdA1 e G - <i>E. coli</i> não transformada (controle).....	62
Figura 24 - Aspecto de larvas de <i>D. saccharalis</i> A - 48 horas após receber injeção de 3 µL do sobrenadante de cultura de <i>P. luminescens</i> IB01, B - 24 horas após receber injeção de 3 µL do sobrenadante de cultura de <i>E. coli</i> não transformada (controle).....	63

LISTA DE TABELAS

1 INTRODUÇÃO

Tabela 1 - Ganho de peso em relação ao peso inicial, por larva, de *G.mellonella* alimentadas com dieta artificial tratada com culturas de *P. luminescens* IB01 e dos clones de *E.coli* IB01-02B04, IB01-02D08, IB01-01D11, IB01-01F02 e TIR-tcdA1..... 60

Tabela 2 - Ganho de peso em relação ao peso inicial, por larva, de *D. saccharalis* alimentadas com dieta artificial tratada com culturas de *P. luminescens* IB01 e dos clones de *E. coli* IB01-02B04, IB0102-D08, IB01-01D11, IB01-01F02 e TIR-tcdA1..... 62

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 - Metodologia experimental do estudo: Experimento A: *G.mellonella* alimentada com dieta artificial tratada com culturas de *P. luminescens* IB01..... 67

2.2 - Cultura bacteriana de *Escherichia coli* (E. coli) e clones de *E. coli*..... 77

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 - INTRODUÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DO BOMBADEIO DE *Diaperidopsis*..... 80

3.1.1 - Identificação do DNA, RNA e proteínas de *Diaperidopsis* em células de *G.mellonella*..... 84

3.1.2 - Sequenciamento do DNA..... 89

3.1.3 - Mapa dos endonúcleos-III..... 91

3.2 - AMPLIFICAÇÃO, CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DE SEQUÊNCIAS DE DNA BOMBADEIO DE *Diaperidopsis*..... 95

3.2.1 - Clonagem do DNA Bom..... 97

3.2.2 - Identificação das sequências de DNA Bom, Bom' e Bom''..... 101

3.2.3 - Clonagem de sequências semelhantes ao DNA Bom..... 103

3.2.4 - Transcrição *in vitro* por *Diaperidopsis* em células vegetais de *G.mellonella*..... 105

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1 - <i>Photorhabdus luminescens</i>	4
2.2 - SIMBIOSE ENTRE <i>Photorhabdus luminescens</i> E NEMATÓIDES DO GÊNERO <i>Heterorhabditis</i>	7
2.3 - TOXINAS DE <i>Photorhabdus luminescens</i>	10
2.4 - CONTROLE BIOLÓGICO	16
2.4.1 - Nematóides entomopatogênicos dos gêneros <i>Steinernema</i> e <i>Heterorhabditis</i> como agentes de controle biológico de pragas	17
2.4.2 - Controle biológico de <i>Diatraea saccharalis</i> (Fabr.) (Lepidoptera: Crambidae)	17
3. MATERIAL E METODOLOGIA	20
3.1 - OBTENÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DO ISOLADO IB01 DE <i>Photorhabdus luminescens</i>	20
3.1.1 - Amplificação do rDNA 16S através de reação em cadeia da polimerase (PCR)	20
3.1.2 - Sequenciamento do rDNA 16S	21
3.1.3 - Análise das seqüências obtidas	21
3.2 - AMPLIFICAÇÃO, CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DE SEGMENTOS DOS GENES <i>tcdA</i> , <i>tccC</i> e <i>mcf</i> DE <i>P. luminescens</i> IB01.....	21
3.2.1 - Extração do DNA total	21
3.2.2 - Amplificação dos segmentos centrais dos genes <i>tcdA</i> , <i>tccC</i> e <i>mcf</i> de <i>P. luminescens</i> IB01	22
3.2.3 - Clonagem do segmento amplificado no vetor pGEM T.....	23
3.2.4 - Transformação por eletroporação em células competentes de <i>Escherichia coli</i>	24

3.2.6 - Amplificação dos segmentos iniciais e finais dos genes <i>tcdA1</i> e <i>tcdA4</i> de <i>P. luminescens</i> IB01	24
3.2.5 - Extração dos plasmídeos dos clones obtidos	25
3.3 - SEQÜENCIAMENTO DOS GENES <i>tcdA1</i> E <i>tcdA4</i> DE <i>P. luminescens</i> IB01 ATRAVÉS DA CONSTRUÇÃO DE UMA SUB-BIBLIOTECA DE PLASMÍDEOS	27
3.4 - CLONAGEM DO GENE <i>tcdA1</i> -IB01 JUNTO À SEQÜÊNCIA TIR NO VETOR pGEM-T Easy	28
3.4.1 - Transferência do segmento <i>SacI</i> do pGREEN-TIR para o pGEM-T Easy	28
3.4.2 - Introdução de sítio de ligação da enzima de restrição <i>Nde I</i> no início do gene <i>tcdA1</i> -IB01.....	29
3.4.3 - Clonagem do segmento de <i>tcdA1</i> contendo os sítios de restrição <i>EcoRI</i> e <i>Nde I</i> no vetor TIRgfp/pGEM-TE	29
3.4.4 - Clonagem do segmento <i>BglII/SphI</i> do gene <i>tcdA1</i> -IB01 no vetor TIR- <i>tcdA1</i> - <i>Nde I</i> /pGEM-TE	30
3.5 - CONSTRUÇÃO DE BIBLIOTECA DE COSMÍDEOS DE <i>P. luminescens</i> IB01	32
3.6 - AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM DE SEQÜÊNCIAS CONSERVADAS DE GENES <i>pks</i> DE <i>P. luminescens</i> IB01	34
3.7 - TESTES DE TOXICIDADE DE <i>P. luminescens</i> IB01 E DOS CLONES DE <i>E. coli</i> CONTENDO GENES <i>tc</i> CONTRA LARVAS DOS INSETOS <i>Galleria mellonella</i> E <i>Diatraea saccharalis</i>	35
3.7.1 - Toxicidade oral e por injeção de <i>P. luminescens</i> IB01 e dos clones de <i>E. coli</i> contendo genes <i>tc</i> sobre larvas de <i>G. mellonella</i>	35
3.7.2 - Toxicidade oral e por injeção de <i>P. luminescens</i> IB01 e dos clones de <i>E. coli</i> contendo genes <i>tc</i> sobre larvas de <i>D. saccharalis</i>	36
4. RESULTADOS	38
4.1 - OBTENÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DO ISOLADO IB01 DE <i>Photorhabdus luminescens</i>	38

4.2 - AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM DOS GENES <i>tcdA</i> DE <i>P. luminescens</i> IB01.....	38
4.3 - SEQUENCIAMENTO DOS GENES <i>tcdA1</i> E <i>tcdA4</i> DE <i>P. luminescens</i> IB01 ATRAVÉS DA CONSTRUÇÃO DE UMA SUB-BIBLIOTECA DE PLASMÍDEOS	44
4.4 - CLONAGEM DO GENE <i>tcdA1</i> JUNTO À SEQÜÊNCIA TIR NO VETOR pGEM-T Easy	51
4.5 - AMPLIFICAÇÃO, CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DE GENES <i>tccC</i> DE <i>P. luminescens</i> IB01	52
4.6 - AMPLIFICAÇÃO, CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DE GENES <i>mcf</i> DE <i>P. luminescens</i> IB01	54
4.7 - AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM DE SEQÜÊNCIAS CONSERVADAS DE GENES <i>pks</i> DE <i>P. luminescens</i> ISOLADO IB01	56
4.8 - CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA DE COSMÍDEOS DE <i>P. luminescens</i> IB01.....	57
4.9 - TOXICIDADE DE <i>P. luminescens</i> IB01 E DOS CLONES DE <i>E. coli</i> CONTENDO GENES <i>tc</i> CONTRA LARVAS DOS INSETOS <i>G. mellonella</i> E <i>D. saccharalis</i>	59
4.9.1 - Toxicidade oral e por injeção de <i>P. luminescens</i> IB01 e dos clones de <i>E. coli</i> contendo genes <i>tc</i> sobre larvas de <i>G. mellonella</i>	59
4.9.2 - Toxicidade oral e por injeção de <i>P. luminescens</i> IB01 e dos clones de <i>E. coli</i> contendo genes <i>tc</i> sobre larvas de <i>D. saccharalis</i>	61
5. DISCUSSÃO	64
6. CONCLUSÕES	76
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

1. INTRODUÇÃO

Photorhabdus luminescens é uma bactéria encontrada no intestino de nematóides do gênero *Heterorhabditis* (Heterorhabditidae) que alterna fases patogênica e simbiótica no seu ciclo de vida e representa uma fonte de novos genes associados à virulência e simbiose. Este entomopatógeno vive em uma "simbiose entre patógenos" com nematóides que invadem insetos, ou seja, a bactéria é simbiótica com nematóides entomopatogênicos, mas se torna patogênica quando é liberada, pelo nematóide, no sistema circulatório do inseto, o qual funciona como um reservatório para a sua reprodução assim como a do nematóide (Forst & Neilson, 1996, Forst et al., 1997).

Vários autores testaram o efeito patogênico de *P. luminescens* sobre larvas de insetos das ordens Lepidoptera (Abdel-Razek, 2003), Coleoptera (Bowen & Ensign, 1998, Guo et al., 1999, Blackburn et al., 1998), Hemiptera (Blackburn et al., 1998) Hymenoptera e Dictyoptera (Bowen & Ensign, 1998).

Foi encontrado que a bactéria produz uma série de substâncias tóxicas que provocam a morte do inseto hospedeiro. Entre estas toxinas encontra-se o complexo denominado proteínas Tc (Bowen & Ensign, 1998), a toxina Mcf (makes caterpillar floppy) (Dabom et al., 2002) e a proteína Txp 40 (Brown et al., 2004 e 2006).

As proteínas Tc purificadas demonstraram toxicidade oral contra larvas de insetos das ordens Coleoptera e Hemiptera (Blackburn et al., 2005, Guo et al., 1999). A toxina Tc purificada demonstrou também toxicidade oral e através de injeção contra larvas de outros insetos das ordens Lepidoptera, Hymenoptera e Dictyoptera (Bowen & Ensign, 1998, Blackburn et al., 1998).

Os genes *tcdA*, *tcdB* e *tccC* de *P. luminescens* já foram clonados com sucesso na bactéria *Escherichia coli* que passou a apresentar atividade tóxica contra larvas do inseto *Manduca sexta* L. (Waterfield et al., 2001). Liu et al. (2003) produziram uma linhagem transgênica de *Arabidopsis thaliana* expressando o gene

tcdA de *P. luminescens*. A toxina produzida pela planta transgênica se mostrou efetiva contra larvas de *M. sexta* e *Diabrotica undecimpunctata howardi*.

Nematóides dos gêneros *Heterorhabditis* e *Steinernema* vêm sendo utilizados com sucesso como agentes de controle biológico de pragas em diversos tipos de cultivo, porém, sua ação está restrita a insetos cujas larvas se desenvolvem nas raízes vegetais. Um esforço no sentido de buscar a distribuição de entomotoxinas na parte aérea das plantas é importante para auxiliar no controle de insetos cujas larvas se desenvolvem e se alimentam destas regiões do vegetal, causando grandes prejuízos para a produção agrícola.

A possibilidade da utilização das entomotoxinas de *P. luminescens* na produção de plantas transgênicas para o controle de pragas da agricultura pode criar uma alternativa para a utilização de *Bacillus thuringiensis* (Bt). A expansão das culturas transgênicas expressando δ -endotoxinas vem criando uma preocupação com relação ao potencial de desenvolvimento de resistência das pragas à toxina.

Uma alternativa à produção de plantas transgênicas, cuja obtenção nem sempre é possível devido a dificuldades técnicas, são as bactérias endofíticas que vêm sendo utilizadas como vetores para a expressão de toxinas visando o controle de pragas (Lacey et al., 2001). A utilização desta estratégia de controle biológico de insetos praga pode apresentar algumas vantagens. Devido a sua localização no interior das plantas, organismos endofíticos transformados podem auxiliar no controle de insetos que se alimentam de tecidos internos da planta, onde agentes químicos e outras formas de controle biológico não são efetivos.

No Brasil, a utilização de nematóides entomopatogênicos vem sendo pesquisada para o controle biológico de pragas de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.), entre elas, *Diatraea saccharalis* Fab., conhecida como broca da cana. A partir de uma cepa do nematóide *Heterorhabditis* sp. coletado no interior do Estado de São Paulo foi isolada uma linhagem de *P. luminescens* denominada IB01 que foi o objeto desta pesquisa.

Os objetivos do presente trabalho foram: a identificação de um isolado nativo de *P. luminescens* (linhagem IB01); a comparação de genes *tccC*, *tcdA* e

mcf da linhagem IB01 com os de outras já estudadas; a clonagem e o seqüenciamento total dos genes *tcdA1* e *tcdA4*; a construção de um vetor para otimização da expressão do gene *tcdA1* em bactérias; a produção de uma biblioteca genômica e identificação de cosmídeos contendo genes *tcdA*; a realização de testes de toxicidade oral e injetável da linhagem IB01 e de clones de *E. coli* contendo genes da mesma contra larvas dos insetos *Galleria mellonella* L. e *D. saccharalis*.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 - *Photorhabdus luminescens*

Photorhabdus luminescens é uma bactéria encontrada no intestino de nematóides do gênero *Heterorhabditis* (Heterorhabditae) que alterna fases patogênica e simbiótica no seu ciclo de vida e representa uma fonte de novos genes associados à virulência e simbiose. Este entomopatógeno vive em uma "simbiose entre patógenos" com nematóides que invadem insetos, ou seja, a bactéria é simbiótica com nematóides entomopatogênicos, mas se torna patogênica quando é liberada pelo nematóide no sistema circulatório do inseto, o qual funciona como um reservatório para a sua reprodução assim como a do nematóide (Forst e Neilson, 1996, Forst et al., 1997).

O gênero *Photorhabdus* foi proposto pela primeira vez por Boemare e colaboradores em 1993 para separar linhagens da bactéria *Xenorhabdus luminescens* que apresentavam diferenças significativas quando comparadas com as outras espécies do gênero. O gênero *Xenorhabdus* consiste quase que inteiramente de espécies simbiotes de nematóides entomopatogênicos (Akhurst, 1983, Boemare et al., 1993, Thomas e Poinar, 1979). O estudo de hibridização de DNA envolvendo 18 linhagens de *Xenorhabdus* resultou em informações sobre o grau de parentesco entre elas, e quatro linhagens previamente identificadas como *X. luminescens* exibiram menos de 20% de homologia com qualquer outra linhagem de *Xenorhabdus* levando à proposição da reclassificação desta espécie em um novo gênero. Fenotipicamente o novo gênero denominado *Photorhabdus* se distingue de todas as outras *Xenorhabdus* spp. por apresentar bioluminescência, atividade da enzima catalase e produção de antraquinona (Boemare et al., 1993, Forst e Nielsen, 1996). A análise comparativa dos ácidos graxos de linhagens dos gêneros *Xenorhabdus* e *Photorhabdus* mostra a existência de diferenças qualitativas e quantitativas entre eles (Janse e Smits, 1990).

A diferença entre os gêneros pode ser ainda demonstrada pelas suas interações com o hospedeiro simbiote, uma vez que, até o presente, *P. luminescens* foi isolada apenas a partir de nematóides do gênero *Heterorhabditis*, enquanto bactérias do gênero *Xenorhabdus* foram isoladas apenas a partir de nematóides do gênero *Steinernema* (Boemare et al., 1993, Forst e Nielsen, 1996).

O novo gênero *Photorhabdus* foi descrito como bacilos gram-negativos, não esporogênicos, bioluminescentes, com mobilidade e pertencentes à família Enterobacteriaceae (Boemare et al., 1993).

Vários autores demonstraram que o gênero *Photorhabdus* constitui um grupo heterogêneo, com base na hibridização DNA-DNA (Akhurst et al., 1996, Farmer et al., 1989) e seqüenciamento do rDNA 16S (Liu et al., 1997, Reiney et al., 1995, Szállás et al., 1997).

A necessidade de desenvolver um método rápido e acurado de identificação de *Photorhabdus* e *Xenorhabdus* spp. levou Brunel e colaboradores (1997) a analisarem o padrão de restrição do gene que codifica o rRNA16S amplificado por PCR. Os resultados mostraram que a técnica foi bastante efetiva em distinguir as linhagens dentro dos gêneros *Photorhabdus* e *Xenorhabdus* e também concordaram com os estudos anteriores que dividem estas bactérias em gêneros diferentes. Porém o trabalho foi realizado com um número restrito de linhagens bacterianas obtidas através de isolamento a partir de coleções de nematóides e, portanto, em 1998, Fischer-Le Saux e colaboradores realizaram uma pesquisa envolvendo um número maior de amostras de simbiontes provenientes do Caribe com a finalidade de conhecer melhor a distribuição ecológica dos genótipos no que diz respeito à taxonomia do nematóide hospedeiro e aos fatores ambientais. Os autores encontraram grande polimorfismo no padrão de restrição do gene rRNA16S das bactérias simbiontes coletadas e compararam os parâmetros: genótipo, nematóide hospedeiro e distribuição geográfica destes isolados com os mesmos parâmetros de linhagens de *Photorhabdus* e *Xenorhabdus* coletadas em várias localidades do mundo. No que diz respeito aos isolados de *Photorhabdus*, foram encontrados quatro genótipos diferentes sendo dois deles exclusivamente simbiontes de *H. indica* e os outros dois de *H. bacteriophora*. Restrita a áreas

tropicais, *H. indica* foi a espécie de nematóide hospedeiro coletada em maior quantidade (87%) em relação a *H. bacteriophora* (10%) que é uma espécie mais homoganeamente distribuída.

O relativo alto nível de diversidade genotípica encontrado pelos autores no trabalho anterior levou a um questionamento com relação ao status taxonômico dos grupos de *P. luminescens* determinados por padrão de restrição do gene rRNA16S. Em 1999, Fischer-Le Saux e colaboradores delinearam espécies e subespécies dentro do gênero *Photorhabdus* aplicando uma abordagem polifásica que combinou hibridização DNA-DNA, seqüenciamento do rDNA 16S e dados fenotípicos. Os autores sugeriram a existência de três espécies entre as linhagens por eles analisadas: *P. luminescens*, linhagem tipo e linhagens provenientes de nematóides que se desenvolvem em regiões quentes; *P. temperata*, linhagens simbióticas de nematóides de regiões temperadas e *P. asymbiotica*, linhagens isoladas de pacientes humanos, aparentemente não simbióticas de nematóides. Entre as espécies *P. luminescens* e *P. temperata* foram propostos subespécies de acordo com a associação simbiótica com diferentes espécies de *Heterorhabditis*. *P. luminescens* subsp. *luminescens* associada a *H. bacteriophora* subgrupo Brecon; *P. luminescens* subsp. *akhurstii* associada a *H. indica*; e *P. luminescens* subsp. *laumondii* associada a *H. bacteriophora* subgrupo HP88. Da mesma forma, foi proposta uma subespécie para *P. temperata*: *P. temperata* subsp. *temperata*, associada a *H. megidis* sub-grupo NTP.

Hazir e colaboradores (2004) encontraram mais duas subespécies de *P. luminescens* isoladas a partir de *H. bacteriophora* coletado em solo da Turquia. A caracterização das novas subespécies foi feita com base em análise filogenética das seqüências do gene rRNA16S, características fisiológicas e testes bioquímicos. As novas subespécies descritas foram denominadas *P. luminescens* subsp. *kayaii* e *P. luminescens* subsp. *thracensis*.

2.2 - SIMBIOSE ENTRE *Photorhabdus luminescens* E NEMATÓIDES DO GÊNERO *Heterorhabditis*

Nematóides do gênero *Heterorhabditis* apresentam uma única fase de vida livre encontrada no solo denominada juvenil infectiva (JI). Nesta fase, os nematóides apresentam uma cutícula protetora, não se alimentam nem se reproduzem, apenas procuram por um inseto hospedeiro. Quando encontram uma larva do inseto presa, os JIs penetram na sua hemocela através da boca, ânus ou espiráculo, perdem a cutícula protetora e passam a se movimentar ativamente liberando as bactérias do seu trato intestinal, que se multiplicam e matam o hospedeiro entre 24 e 48 horas. Em seguida, o nematóide se alimenta da larva morta ingerindo concomitantemente as células vivas da bactéria, e se transforma na fase adulta reprodutiva hermafrodita. Nesta fase, até três gerações podem ser produzidas dentro de um único hospedeiro em um período de 10 a 20 dias e, aparentemente em resposta a possibilidade de escassez de alimento, os adultos reprodutivos se diferenciam na fase juvenil infectante (JI) no interior do corpo da mãe em um processo conhecido por endotoquia matricida e deixam o cadáver do inseto para procurar por novas presas (Forst e Neilson, 1996; Forst et al., 1997; Ciche e Ensign, 2003).

A necessidade da presença de células vivas de *P. luminescens* associadas ao nematóide *H. bacteriophora* para o sucesso da sua reprodução foi constatada por Han e Ehlers (2000). Larvas do inseto *Galleria mellonella* L., provenientes de cultura axênica, foram tratadas com juvenis infectantes axênicos de *H. bacteriophora* que foram incapazes de matar as larvas do hospedeiro *G. mellonella*. A injeção de sobrenadante de diferentes culturas de *P. luminescens* matou os insetos, mas não foi capaz de fornecer nutrientes para o futuro desenvolvimento dos nematóides. Somente a injeção de células bacterianas pôde sustentar a propagação dos nematóides no inseto axênico.

Através de utilização de transposons para a indução de mutação, Ciche e colaboradores (2001) obtiveram um mutante de *P. luminescens* que definitivamente falhou em subsidiar o crescimento e reprodução do nematóide *H. bacteriophora*. O gene *ngrA*, interrompido pelo transposon, parece codificar a

enzima fosfotanteinil transferase requerida para a biosíntese de sideróforos e moléculas que apresentam atividade antibiótica. Porém é improvável que a perda da capacidade de produzir estes compostos esteja diretamente envolvida com a perda da capacidade de suportar o crescimento do nematóide, uma vez que adicionando o sobrenadante de cultura de *P. luminescens* selvagem ao meio de cultura dos nematóides, o seu crescimento não foi observado. Além disso, mutantes de *P. luminescens* incapazes de produzir sideróforos não impedem o crescimento de *H. bacteriophora*. Os autores sugerem que o gene *ngrA* esteja envolvido na produção de um hormônio ou um regulador de sinal.

Além de dar condições para a reprodução do nematóide simbiote, bactérias do gênero *Photobacterium* também são necessárias para o sucesso da colonização do inseto presa pelo parasita (Forst et al., 1997, French-Constant et al., 2003). Bactérias deste gênero são capazes de suprimir o sistema imunológico da presa e se proliferam no seu interior colonizando a hemocela e o trato intestinal do inseto, onde promovem significativas modificações na parede o que acaba por impossibilitar sua alimentação (Blackburn et al., 1998). Além disso, *Photobacterium* spp. produz antibióticos que evitam a proliferação de outros microrganismos evitando a competição por alimento no cadáver da presa (Sharma et al., 2002).

Na tentativa de determinar genes requeridos para ambos os processos de simbiose e patogenicidade desenvolvidos por *P. luminescens*, Bennett e Clarke (2005), trabalhando com a linhagem TT01, obtiveram mutantes utilizando a inserção de transposons. Foi isolado um mutante cuja inserção do transposon ocorreu em um gene anotado como *pbgE1* no genoma de *P. luminescens* linhagem TT01. Este gene faz parte de um operon homólogo ao operon *pmrHFJKLM* de *Salmonella enterica* que codifica proteínas responsáveis pela biosíntese de L-arabinose e a subsequente ligação deste amino-açúcar com lipídios de LPS da bactéria. O mutante, denominado BMM305, mostrou-se não virulento a larvas do inseto *G. mellonella* provavelmente devido à maior sensibilidade a CAMPs (polimixina B) e à incapacidade de produzir o antígeno O na superfície do LPS. A transformação do mutante *pbgE1* com os genes *E1*, *E2* e *E3* do operon *pbg* diminuiu a sensibilidade a CAMPs, restaurou a capacidade de

sintetizar o antígeno O e, conseqüentemente, a virulência à larva do inseto, porém, quando a transformação foi feita apenas com o gene *pgbE1*, a capacidade de sintetizar o antígeno O não foi restaurada e nem a virulência, levando os autores a sugerir que a presença do antígeno O seja necessária para que a bactéria provoque a morte das larvas do inseto. Com relação à simbiose, o mutante BMM305 mostrou-se incapaz de colonizar o intestino do nematóide *H. bacteriophora* e, portanto, de estabelecer a relação simbiótica.

P. luminescens apresenta duas fases no seu ciclo de vida denominadas fase I ou primária e fase II ou secundária. A fase primária se caracteriza por células bacterianas com corpos de inclusão que são encontradas no intestino da fase juvenil infectiva do nematóide *Heterorhabdits* spp., são liberadas na larva do inseto e passam a se alimentar e multiplicar à custa de seu cadáver. Nesta fase, a bactéria se associa novamente ao nematóide permitindo sua produção em grande quantidade para a finalidade de controle biológico. A fase secundária inibe a propagação do nematóide *in vitro* e se caracteriza pela ausência de corpos de inclusão no interior das células que permanecem em estado de repouso no intestino do nematóide (Bintrim e Ensign, 1998).

Variação de fases em bactérias entomopatogênicas ocorre provavelmente como mecanismo de adaptação a mudanças ambientais e escape do sistema imunológico do hospedeiro. (Chiche e Ensign, 2003)

A mudança da fase primária para a secundária pode ser provocada pela baixa osmolaridade do meio de cultura como demonstrou Krasomil-Osterfeld (1995). Durante seu ciclo com fases simbiótica e patogênica, *P. luminescens* encontra diferentes condições ambientais às quais precisa se adaptar fisiologicamente. Durante a fase de desenvolvimento na larva do inseto, o alimento é abundante e a osmolaridade elevada, no período de dormência dentro do intestino do nematóide ou livre no solo, a bactéria passa por uma fase de falta de alimento e baixa osmolaridade.

2.3 - TOXINAS DE *Photorhabdus luminescens*

A bactéria *P. luminescens* produz uma série de substâncias tóxicas que provocam a morte do inseto hospedeiro. Entre estas toxinas encontra-se o complexo denominado proteínas Tc (Bowen e Ensign, 1998), a toxina Mcf (makes caterpillar floppy) (Daborn et al., 2002 e Waterfield et al. 2003) e a proteína Txp 40 (Brown et al., 2004 e 2006), esta última também produzida pelo entomopatógeno *Xenorhabdus nematophila*.

Um grande número de toxinas produzidas por *P. luminescens* pode estar envolvido na morte de uma ampla variedade de insetos. Algumas podem agir sinergisticamente ou serem usadas em redundância garantindo a morte rápida do hospedeiro. Algumas destas toxinas podem ainda provocar a morte dos insetos por interferência no seu desenvolvimento. Duchaud e colaboradores (2003) seqüenciaram o genoma completo de *P. luminescens* linhagem TT01 e encontraram 5.688.987 pares de bases contendo 4.839 genes que codificam prováveis proteínas. Surpreendentemente, ele codifica um grande número de adesinas, toxinas, hemolisinas, proteases e lipases, e contém uma larga série de genes para a síntese de antibióticos. Estas proteínas provavelmente representam um papel importante na eliminação de competidores, colonização do hospedeiro, invasão e bioconservação do cadáver do inseto, fazendo de *P. luminescens* um modelo promissor para o estudo de simbiose e interação patógeno-hospedeiro. Comparação entre os genomas de bactérias relacionadas revelou a aquisição de fatores de virulência por uma extensiva transferência horizontal e forneceu indicações sobre a evolução de um patógeno de insetos. Além disso, proteínas inseticidas identificadas recentemente podem ser alternativas efetivas para o controle de insetos praga.

P. luminescens defende o cadáver do inseto hospedeiro contra o estabelecimento de competidores microbianos produzindo antibióticos que atuam contra uma diversidade de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Foerst e Neilson, 1996; French-Constant et al., 2000 e 2003; Williams et al., 2005; Hu et al., 2006). O genoma da linhagem TT01 contém 33 genes, agrupados em 20 loci,

codificando proteínas similares a policetideos e peptídeos sintases não ribossomais que podem fazer parte das vias metabólicas destes antibióticos (Duchaud et al., 2003). No genoma da linhagem W14 de *P. luminescens* também foram encontradas seqüências que apresentam semelhança com seqüências de policetideo sintases de outras bactérias patogênicas (French-Constant et al., 2000).

Waterfield e colaboradores (2002) encontraram, através da construção de uma biblioteca de cosmídeos, o gene *mcf* ("makes caterpillars floppy"), que codifica uma toxina de alto peso molecular denominada de Mcf por provocar flacidez em larvas de *M. sexta*. Além do fenótipo flácido, a proteína Mcf parece conferir à *E. coli* a capacidade de permanecer no inseto hospedeiro e matá-lo. A análise histológica das larvas mortas mostrou que a proteína causa destruição de hemócitos impedindo o funcionamento do sistema de defesa do hospedeiro e também a destruição do intestino médio das larvas provocando perda de turgor e flacidez (fenótipo "floppy").

Ilhas genômicas são regiões do genoma bacteriano responsáveis por um único aspecto do comportamento da bactéria, como simbiose ou patogenicidade. Quando estas regiões estão envolvidas em patogênese elas são denominadas ilhas de patogenicidade. Foram descritas ilhas de patogenicidade de *P. luminescens* subsp. *akhurstii* linhagem W14 que codificam fatores envolvidos aparentemente em ambos os processos de simbiose e patogenicidade. As estruturas destas ilhas são comparáveis com aquelas encontradas em patógenos de mamíferos. As ilhas de patogenicidade de *P. luminescens* parecem carregar elementos similares a organização genômica de ilhas de patogenicidade de outras Enterobacteriaceae, apesar do fato de elas codificarem toxinas com funções diferentes (Waterfield et al., 2004).

Entre as substâncias produzidas por *P. luminescens* que agem como inseticidas, as toxinas Tc vêm recebendo atenção dos pesquisadores devido, entre outras propriedades, à sua ação contra insetos das ordens Coleoptera, Lepidoptera, Homoptera, Hemiptera, Hymenoptera e Dictyoptera, contrastando com o relativo limitado espectro de ação das endotoxinas de *Bacillus thuringiensis*

que muitas vezes são específicas para um determinado grupo de insetos (Höfte e Whitely, 1989, Bowen et al. 1998, Crickmore et al. 1998).

Bowen e Ensign (1998) demonstraram a atividade inseticida de proteínas produzidas por três isolados (W-14, NC-19 e Hm) de *P. luminescens* injetando células da bactéria em larvas do inseto *Manduca sexta*. A morte das larvas ocorreu 24 horas após a injeção de aproximadamente 100 células. Os três isolados de *P. luminescens* foram também testados com relação à atividade inseticida do sobrenadante do meio onde as bactérias foram cultivadas. Amostras da cultura esterilizadas por meio de filtração foram injetadas em larvas de *M. sexta*. Vinte e quatro horas depois, as larvas pararam de se alimentar e mais de um terço morreu após 72 horas. A administração oral de sobrenadantes das culturas, concentrados através de ultrafiltração, das três linhagens mostrou maior suscetibilidade dos insetos à atividade tóxica da linhagem W-14 uma vez que na concentração de 15 vezes foi capaz de provocar a morte de 70 % das larvas e nenhuma atividade letal foi observada para as outras linhagens na mesma concentração. A atividade inseticida das toxinas de W14 foi perdida quando aquecidas ou tratadas com proteinase K, determinando sua natureza protéica, porém não foi observada atividade enzimática de lipase, proteinase ou fosfolipase que normalmente estão associadas à virulência. A purificação da toxina inseticida resultou em um complexo protéico de aproximadamente 1.000 kDa que foi separado em três frações através de eletroforese em gel de agarose. A fração correspondente à banda 1 apresentou atividade inseticida quando injetada ou administrada oralmente em larvas de *M. sexta*. A fração correspondente à banda 2 apresentou atividade inseticida apenas quando injetada nas larvas e a fração correspondente à banda 3 não apresentou atividade inseticida. A toxina purificada demonstrou também toxicidade oral e através de injeção contra larvas de outros insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera e Dictyoptera.

O complexo de toxinas inseticidas produzidas pela linhagem K-1 de *P. luminescens* foi purificado e caracterizado como dois complexos protéicos de aproximadamente 1.000 kD e ativo contra larvas de *Spodoptera litura* Fab. e *G. mellonella*. A linhagem K-1 foi isolada de *H. indica* coletado no sul da Índia e

identificada como *P. luminescens* subsp. *akhurstii* através de testes fenotípicos e bioquímicos, além da análise do padrão de restrição de fragmento do gene 16S rRNA (Rajagopal e Bhatnagar, 2002). Os autores comentam que o trabalho é a primeira comunicação a respeito das toxinas desta subespécie, uma vez que quando Bowen e Ensign em 1998 reportaram as toxinas da linhagem W14 de *P. luminescens*, a reclassificação de *Photorhabdus* em espécies e subespécies (Fischer-Le Saux et al., 1998 e 1999) ainda não havia sido proposta.

Para a realização de estudos histopatológicos, larvas de *M. sexta* receberam dieta tratada com 1 µg de complexo protéico Tca purificado (concentração correspondente a 50 % da dose letal - LD₅₀) ou injeções diretamente na hemocela contendo 550 ng de Tca. O complexo protéico denominado aqui de Tca corresponde à fração 1 do complexo protéico purificado no trabalho de Bowen e Ensign (1998). As larvas que ingeriram dieta tratada com Tca pararam de se alimentar após 24 horas, mas foram capazes de sobreviver por vários dias, porém com ganho de peso muito menor em comparação ao controle. Larvas que receberam injeção de Tca na hemocela continuaram a se alimentar por dois a três dias e morreram 24 horas depois de cessada a alimentação. Ambos os tratamentos provocaram desarranjo no epitélio intestinal com a formação de vesículas pelas células colunares que são lançadas no lúmen intestinal na região do intestino médio (Blackburn et al., 1998).

A purificação das toxinas Tc de *P. luminescens* W14 mostrou que a linhagem apresenta quatro complexos de toxinas denominados Tca, Tcb, Tcc e Tcd, que foram separados por HPLC (Bowen et al., 1998). Anticorpos monoclonais e policlonais produzidos contra estes complexos protéicos purificados foram utilizados para selecionar clones de *E. coli* contendo os genes responsáveis pela codificação das toxinas em uma biblioteca genômica de *P. luminescens* W14. Foram identificados clones que codificam as toxinas Tc e, embora sua expressão tenha sido comprovada através de reconhecimento por anticorpos, elas não foram processadas nem exportadas, não apresentando atividade tóxica contra larvas de *M. sexta*. Foi realizada também a interrupção dos loci codificadores das toxinas Tc de *P. luminescens* gerando os mutantes *tca*⁻, *tcb*⁻, *tcc*⁻ e *tcd*⁻. Inativação dos genes

tca e *tcd* provocou uma drástica redução na letalidade e correspondente aumento no ganho de peso relativo das larvas de *M. sexta* sobreviventes. A inativação de ambos os loci gerando uma linhagem *tca⁻/tcd⁻* aboliu completamente a toxicidade oral, enquanto os mutantes *tcb⁻* e *tcc⁻* apresentaram toxicidade oral reduzida.

Guo e colaboradores (1999), buscando proteínas inseticidas que pudessem ser utilizadas para a produção de plantas transgênicas resistentes a insetos, verificaram que a linhagem W14 de *P. luminescens* produz em meio de cultura duas proteínas, denominadas A e B, que apresentam efeito tóxico sobre as larvas de *Diabrotica undecimpunctata howardi* Bar., uma importante praga da cultura de milho que não é eficientemente controlada pelas endotoxinas de *B. thuringiensis*. Com base nos resultados das clonagens realizadas neste trabalho, os autores concluíram que as toxinas A e B encontradas, são idênticas respectivamente aos peptídeos TcdA codificado pelo gene *tcdA*, locus *tcd*, e TcbA, codificado pelo gene *tcbA*, locus *tcb*, descritos por Bowen e colaboradores (1998).

Com a finalidade de identificar genes que codificam potenciais fatores de virulência, foram analisadas 2.000 seqüências ao acaso, a partir de uma biblioteca genômica da linhagem W14 de *P. luminescens* (French-Constant et al. 2000). Os autores verificaram a existência de mais do que quatro loci de genes *tc* uma vez que várias cópias dos loci *tca*, *tcb/tcd* e *tcc* foram encontradas. As proteínas Tc previstas têm três áreas de similaridade entre elas e, apesar da aparente complexidade dos loci, somente três tipos básicos de elementos genéticos podem ser encontrados: genes tipo *tcaAB* ou *tcdA*; genes tipo *tcaC* ou *tcdB* e genes tipo *tccC*. Homólogos destes elementos têm sido encontrados em várias bactérias e sua conservação sugere que estes três componentes básicos são necessários para a atividade oral deste complexo protéico contra insetos (Waterfield et al., 2001a).

A atividade oral das toxinas produzidas por *P. luminescens* contra larvas de insetos não era esperada uma vez que, na natureza, as células da bactéria são depositadas diretamente na circulação (hemolinfa) da larva do inseto hospedeiro pelo nematóide vetor. Uma possível explicação para esta atividade oral proposta por Waterfield e colaboradores (2005), seria o fato de outros entomopatógenos

como por exemplo *Serratia entomophila*, apresentar genes semelhantes àqueles que codificam toxinas em *P. luminescens* cujo produto é tóxico a larvas de insetos quando ingerido. Tais genes encontram-se em um plasmídeo conjugativo, sendo possível que tenham sido adquiridos por bactérias do gênero *Photorhabdus* e posteriormente tenham sofrido modificações que levaram a produção de toxinas que são ativas em ambos os lados do intestino da larva hospedeira.

Waterfield e colaboradores (2001b) demonstraram que a combinação de três genes, *tcdA*, *tcdB* e *tccC*, é essencial para a toxicidade oral contra larvas do inseto *M. sexta* quando a expressão destes genes é feita em *E. coli*. Foram construídos plasmídeos com diferentes combinações destes genes que foram utilizados para transformar *E. coli* e também uma linhagem de *P. luminescens* que não apresenta toxicidade oral contra *M. sexta* (linhagem K122). No caso da expressão em *E. coli*, além da presença dos três genes, o acréscimo de mitomicina C ao meio de cultura ou a ruptura mecânica das células é essencial para ocorrência de toxicidade oral máxima sugerindo a necessidade de liberação das moléculas de toxina que podem estar associadas à membrana celular. O plasmídeo contendo os genes *tcd* confere à linhagem K122 de *P. luminescens* toxicidade oral superior àquela verificada para a linhagem W14, demonstrando a possibilidade de se construir uma linhagem recombinante ainda mais tóxica do que a original.

O gene *tcdA* de *P. luminescens* codifica uma proteína de 283 kDa, toxina A, que é altamente tóxica a uma variedade de insetos, incluindo algumas importantes pragas da agricultura. Foi testada a eficácia da toxina A transgênica em *Arabidopsis thaliana* L. Heynh para o controle de insetos que se alimentam dela (Liu et al., 2003). Plantas expressando toxina A acima de 700 ng/mg de proteínas extraídas se mostraram altamente tóxicas a *M. sexta*. Toxina A isolada de plantas transgênicas também inibiu fortemente o crescimento da praga de milho *D. undecimpunctata howardi*. Adição de regiões 3' e 5' não traduzidas do gene osmotin (*osm*) de tabaco aumentou em 10 vezes a produção de toxina e em 12 vezes a recuperação de linhagens resistentes ao inseto. Na melhor linhagem a alta expressão da toxina A e a resistência ao inseto foi mantida em pelo menos

cinco gerações em toda a progênie. O mRNA *tcdA* intacto representa o maior produto de transcrição de um transgene em plantas efetivo até a data.

Embora o gene *tcdA1* inserido no genoma de *A. thaliana* tenha sido expresso e capaz de promover toxicidade oral a larvas de *M. sexta* e *D. undecimpunctata howardi*, a atividade tóxica oral completa de TcdA1 requer a ação de dois outros produtos gênicos do complexo Tc, TcdB1 e TccC1 ou TcdB2 e TccC3. A potencialização da toxina TcdA1 requer que os genes *tcdA1*, *tcdB1* e *tccC1* sejam expressos no mesmo citoplasma (Waterfield et al., 2005).

2.4 - CONTROLE BIOLÓGICO

Insetos são naturalmente atacados por entomopatógenos e parasitóides, que são importantes reguladores de população. A utilização destes vem sendo estudada e em alguns casos aplicada com a finalidade de controlar pragas de culturas agrícolas. Esta prática, conhecida como controle biológico, apresenta uma série de benefícios que devem ser considerados além de apenas sua eficiência e custo. Estes benefícios incluem segurança para a espécie humana, e outros organismos que não sejam o alvo de controle, redução de resíduos de agrotóxicos nos alimentos e no solo, preservação de outros inimigos naturais e aumento da biodiversidade em ecossistemas cultivados.

Agentes de controle biológico de pragas podem ser eficientes e servir de alternativa para inseticidas químicos de largo espectro de ação. No entanto, um incremento no uso destes agentes deve vir acompanhado de: aumento da sua virulência e velocidade da letalidade, manutenção ou melhora do desempenho em condições ambientais adversas, produção eficiente, formulação que permita fácil aplicação, persistência no ambiente e longo período de armazenamento, bom entendimento de como se encaixa no ambiente e sua interação com outros componentes de manejo integrado e, por fim, aceitação pelos produtores e público consumidor (Lacey et al., 2001).

2.4.1 - Nematóides entomopatogênicos dos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis* como agentes de controle biológico de pragas

Nematóides entomopatogênicos dos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis*, que se associam com bactérias dos gêneros *Xenorhabdus* e *Heterorhabdus* respectivamente, vêm sendo utilizados como eficientes agentes controladores biológicos de diversas pragas de solo. Em todo o mundo, estes nematóides vêm sendo utilizados comercialmente no controle de diversas pragas, e respondem pela segunda maior quantidade comercializada de agentes de biocontrole, depois de *Bacillus thuringiensis*. (Lacey et al., 2001)

No Brasil, Machado e colaboradores (2005) testaram a eficiência "in vitro" dos nematóides *Heterorhabditis indica* e *Steinernema glaseri* no controle do coleóptero *Migdolus fryanus* West., uma importante praga da cultura de cana-de-açúcar. Ambos parasitam diferentes fases do desenvolvimento de *M. fryanus* (ovo, larva recém-eclodida e larva em estágio final de desenvolvimento) causando a morte do inseto. *H. indica* se mostrou mais eficiente do que *S. glaseri* em causar a morte das larvas de *M. fryanus* no estágio final de desenvolvimento.

Uma linhagem de *Heterorhabditis* isolada de solo no município de Itapetininga, SP, se mostrou eficiente contra ninfas da cigarrinha da raiz da cana-de-açúcar, *Mahanarva fimbriolata* Stål, em condições de laboratório (100 % de mortalidade), e foi então escolhida para testes em campo (Leite et al., 2005). O controle promovido pelo nematóide pode ser comparado ao do inseticida tiametoxam e do fungo *Metarhizium anisopliae*, utilizado como agente de controle biológico de insetos praga.

2.4.2 – Controle biológico de *Diatraea saccharalis* (Fabr.) (Lepidoptera: Crambidae)

O inseto *Diatraea saccharalis* conhecido como broca da cana-de-açúcar, é considerado a principal praga desta cultura especialmente na Região Sudeste do Brasil onde causa aos produtores prejuízo significativo.

O ciclo da broca no canavial começa com as mariposas, que colocam pequenos ovos na parte de baixo das folhas. Quando os ovos eclodem, saem

minúsculas larvas, de cerca de 1 a 2 milímetros, que caminham em direção à região próxima ao colmo da planta, onde penetram e se alimentam da polpa carnuda e doce. Dentro da cana, as larvas vão mudando de fase, até atingir cerca de 3 a 4 centímetros, quando saem da planta, transformam-se novamente em mariposas e dão início a um novo ciclo de vida do inseto. As galerias feitas por esses insetos mastigadores ocupam praticamente todo o interior da planta, provocando diminuição da massa vegetal e falha na germinação, que além de reduzir a tonelagem por área, não raro, exige custosos replantes.

Ocorrem também prejuízos indiretos consideráveis, pois as aberturas (orifícios e galerias) permitem entrada dos fungos *Colletotrichum falcatum* Went e *Fusarium moniliforme*, que invertem a sacarose em glucose, diminuindo a pureza do caldo e o peso do açúcar (Gallo et al., 1988). Quando a matéria-prima se destina à produção de álcool, o problema é ainda mais grave, pois os microorganismos invasores contaminam o caldo e concorrem com as leveduras na fermentação.

O controle biológico desta praga no Brasil encontra-se bastante desenvolvido, principalmente através do emprego da vespa *Apanteles flavipes* = *Cotesia flavipes* Cameron (Hymenoptera, Braconidae), um parasitóide das larvas de *Diatraea* spp. originária de Trinidad e Tobago e introduzida no Brasil em 1974 (Botelho, 1992).

Porém, os pequenos produtores não têm como fazer o controle biológico porque não há produção suficiente de vespas em escala comercial, sem contar que elas têm de ser liberadas na plantação nas condições ideais de temperatura e quantidade para surtir efeito. E a partir do momento em que a broca penetra na cana as perdas são inevitáveis, porque nessa fase não é mais possível recorrer ao controle biológico nem ao químico, devido ao alto custo dos inseticidas e à baixa eficiência dos produtos, incapazes de atingir as lagartas no interior da planta.

Embora *C. flaviceps* seja eficiente no controle de broca da cana-de-açúcar, parasitóides de ovos do gênero *Trichogramma* vêm sendo estudados por diversos pesquisadores (Lima Filho e de Lima, 2003).

Botelho e colaboradores (1999) observaram a eficiência de *Trichogramma galloi* Zucchi no controle de *D. saccharalis* em locais de altas infestações e baixa predação de ovos, assim como ação sinérgica da sua associação com *C. flavipes*. Em determinadas situações, o parasitóide larval *C. flavipes* não é tão eficiente no controle biológico de *D. saccharalis*, particularmente quando a predação de ovos por espécies nativas de insetos é baixa. Aumentando-se a predação de ovos com a liberação de *T. galloi*, as lagartas provenientes de ovos sobreviventes podem ser melhor controladas por *C. flavipes*, reduzindo as perdas causadas pela broca da cana-de-açúcar nas situações mencionadas, características de áreas do Brasil Central.

Outra forma de controle biológico de *D. saccharalis* que vem sendo avaliada no Brasil é a utilização do fungo *Beauveria bassiana* (Wenzel et al., 2006). Os autores verificaram que o fungo causou morte de até 89 % das lagartas da broca da cana-de-açúcar, 6 dias após tratamento com suspensão de conídios na concentração de 5×10^8 /mL.

Não foram encontrados na literatura relatos sobre o emprego de nematóides entomopatogênicos para o controle de *D. saccharalis*, embora larvas deste inseto tenham sido utilizadas para a multiplicação de *Steinernema carpocapsae* (Folegatti et al., 1988). Tampouco foram encontrados estudos sobre o efeito de bactérias do gênero *Photorhabdus* ou de suas toxinas sobre esta praga.

3. MATERIAL E METODOLOGIA

3.1 - OBTENÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DO ISOLADO IB01 DE *Photorhabdus luminescens*

O isolado de *Photorhabdus luminescens* utilizado no presente trabalho foi isolado do interior de larvas do nematóide *Heterorhabditis* sp no laboratório de Controle Biológico do Instituto Biológico de Campinas (SP) e foi denominado IB01.

3.1.1 - Amplificação do rDNA 16S através de reação em cadeia da polimerase (PCR)

A identificação da bactéria foi feita por seqüenciamento do rDNA 16S.

A amplificação foi feita através de PCR com a utilização dos *primers* universais para bactérias fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e rP1 (5'-ACGGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Weisburg et al., 1991). Com o auxílio de palito de madeira esterilizado, uma amostra de colônia do isolado bacteriano foi transferida para microtubo contendo 50 µl da seguinte solução: 5 µL de tampão 10x; 5 µL de MgCl₂ (25 mM); 1 µL de dNTPs (10 mM cada); 1 µL de cada *primer* (10 µM); 0,5 µL da enzima Taq DNA polimerase (5 U/µL); 36,5 µL de água estéril. Todos os reagentes utilizados foram da marca Invitrogen.

Em seguida, procedeu-se a amplificação em termociclador (PerkinElmer - GeneAmp PCR System 2400) utilizando-se o seguinte programa: desnaturaçãõ inicial a 94 °C por 4 min; 40 ciclos de desnaturaçãõ a 94 °C por 30 s, anelamento a 60 °C por 30 s e extensãõ de *primers* a 72 °C por 1 min e 30 s; extensãõ final a 72 °C por 4 min.

Uma amostra (5 µL) do produto da amplificaçãõ foi visualizada por eletroforese em gel de agarose 0,8 % com o corante brometo de etidio (0,1 µg/mL) em tampãõ TAE (0,04 M Trisacetato pH 8,0 + 1 mM EDTA) para a verificaçãõ da presença de um fragmento de aproximadamente 1.500 pb.

3.1.2 - Seqüenciamento do rDNA 16S

O produto de amplificação correspondente ao rDNA 16S foi purificado com o PureLink PCR Purification kit (Invitrogen), seguindo instruções do fabricante. O produto foi totalmente seqüenciado utilizando-se os primers 1D1 e rP1, para as extremidades 5' e 3', e os primers internos 16S-F2 (5'-AGCAGCCGCGGTAATAC-3') e 16S-F3 (5'-ATACCCTGGTAGTCCACGC-3'). O seqüenciamento foi realizado com o reagente Big Dye Terminator (Applied Biosystems) e o aparelho seqüenciador de DNA ABI PRISM 377 (Applied Biosystems).

3.1.3 - Análise das seqüências obtidas

A seqüência do rDNA 16S do isolado IB01 de *P. luminescens*, determinada conforme descrito no item 3.1.2 foi comparada com aquelas presentes no banco de dados internacionais GenBank através do programa BLASTn (Altschul et al., 1990). O alinhamento de seqüências foi realizado com os programas ClustalX (Thompson et al., 1997) e BioEdit (Hall, 1999).

3.2 - AMPLIFICAÇÃO, CLONAGEM E SEQÜENCIAMENTO DE SEGMENTOS DOS GENES *tcdA*, *tccC* e *mcf* DE *P. luminescens* IB01

3.2.1 - Extração do DNA total

O isolado IB01 de *P. luminescens* foi incubado em 5 mL de meio LB (triptona, 10 g; extrato de levedura, 5 g; NaCl, 5 g em 1 L de água), sob agitação a 26 °C até a saturação (aproximadamente 24 h). Uma alíquota de 1,5 mL da cultura foi centrifugada por 2 min, 12.000 g e o pellet foi ressuspenso através de pipetagem em 567 µL de tampão TE (10 mM Tris HCl pH 8,0, 1 mM EDTA). Foram adicionados 30 µL de SDS 10% e 3 µL de proteinase K (20 mg/mL) à suspensão de células que foi incubada por 1 h a 37 °C. Em seguida adicionou-se 100 µL de NaCl 5M e 80 µL de CTAB/NaCl (CTAB 100 g/L, NaCl 41 g/L) e a mistura foi incubada por 10 min a 65 °C. Uma extração foi feita através de adição de igual volume de clorofórmio/álcool isoamil (24:1) e centrifugação por 5 min a 12.000 g. O sobrenadante foi transferido para um tubo novo ao qual foi adicionado igual

volume de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) e o material foi agitado e novamente centrifugado por 5 min a 12.000 g. O sobrenadante foi transferido para tubo novo e adicionado 0,6X o seu volume de isopropanol que foi misturado gentilmente até ocorrer à precipitação do DNA. O DNA precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 70 %, seco e ressuspensionado em 100 μ L de tampão TE.

3.2.2 – Amplificação dos segmentos centrais dos genes *tcdA*, *tccC* e *mcf* de *P. luminescens* IB01

Foram utilizados os *primers* *tcdA*-F1 (5'-ACRCGYTTTGCNGAYTGGGT-3') e *tcdA*-R1 (5'-CCGYTGAARTCCATTGGYTC-3') para a amplificação de segmentos dos genes *tcdA*; *tccC*-F (5'-GNGARGARCAAYGGNAAYG-3') e *tccC*-R (5'-CCRTANGGRTARTAYTCYTC-3') para a amplificação dos genes *tccC* e *mcf*-F (5'-TCTGGCYACCGCNCTNAA-3') e *mcf*-R (5'-GAAAGATGTAGAARTCRTARTCRAA-3') para a amplificação dos genes *mcf* de *P. luminescens* a partir do DNA total da bactéria obtido conforme descrito no item 3.2.1. Estes *primers* foram desenhados com base no alinhamento das seqüências de genes *tcdA*, *tccC* e *mcf* disponíveis no GenBank para os isolados W14 e TT01 de *P. luminescens*, conforme mostram as Figuras 1, 2 e 3. Para os genes *tcdA*, os tamanhos previstos para os produtos amplificados seriam de 2230 a 2966 pb, para os genes *tccC*, de 933 a 966 pb e para os genes *mcf*, de 917 pb.

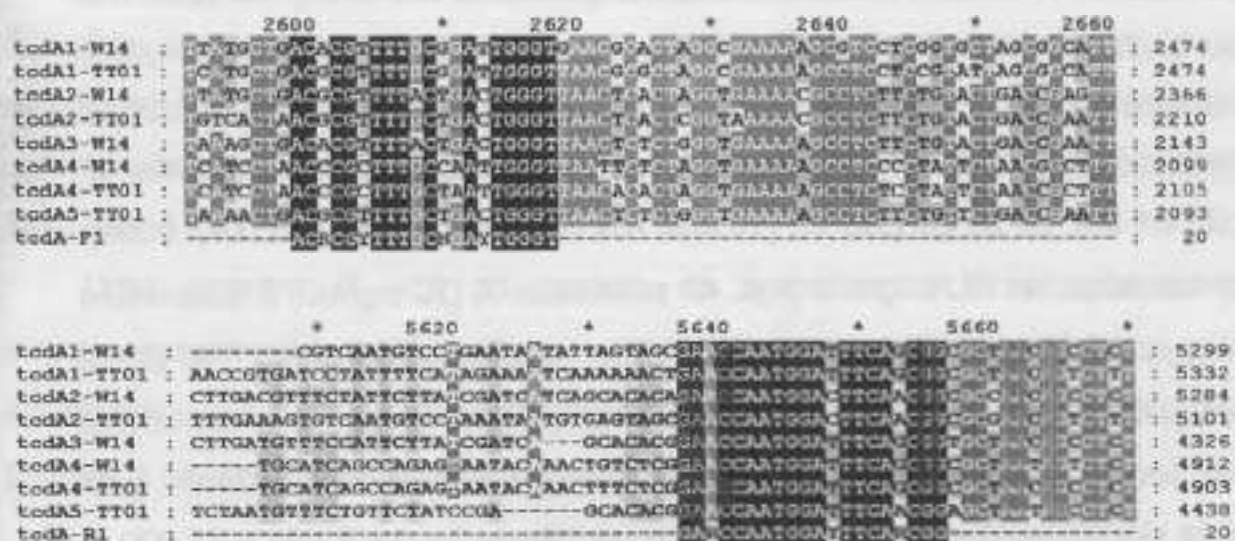


Figura 1 - Desenho dos *primers* *tcdA*-F1 e *tcdA*-R1 baseado no alinhamento das seqüências nucleotídicas de genes *tcdA* de *P. luminescens* W14 e TT01.

programas: 94 °C por 2 min, seguido de 40 ciclos de 94 °C por 30 s, 56 °C por 30 s, 72 °C por 2 min e 40 s e extensão final a 72 °C por 4 min para amplificação de segmentos dos genes *tcdA*; 94 °C por 2 min, 40 ciclos de 94 °C por 30 s, 46 °C por 30 s e 72 °C por 60 s e extensão final a 72 °C por 4 min para amplificação de segmentos dos genes *tccC* e 94 °C por 2 min, 40 ciclos de 94 °C por 30 s, 56 °C por 30 s e 72 °C por 60 s e extensão final a 72 °C por 4 min para amplificação de segmentos dos genes *mcf*.

Os produtos amplificados foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 0,8 % para a verificação da presença de fragmentos que foram extraídos e purificados utilizando-se o kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen) seguindo as instruções do fabricante.

3.2.3 - Clonagem dos segmentos amplificados no vetor pGEM-T

Os produtos purificados das PCRs dos segmentos dos genes *tcdA*, *tccC* e *mcf* de *P. luminescens* foram clonados separadamente no vetor pGEM-T Easy (Promega).

A reação de ligação com o vetor foi realizada a misturando-se 7 µL do DNA proveniente da amplificação, 1 µL de tampão de ligação 10x, 1 µL do vetor pGEM-T Easy e 1 µL da enzima T4 DNA ligase (3 U/µL) e incubação a 16 °C por 12 horas.

3.2.4 - Transformação por eletroporação em células competentes de *Escherichia coli*

Os produtos de ligação com o vetor foram precipitados com 1 µL de acetato de sódio 3M pH 5,2 e 27 µL de etanol absoluto durante 10 min a - 80 °C. Após a centrifugação da amostra (20 min, 12.000 g, 4 °C), o sedimento foi lavado com etanol 70 % e submetido a secagem à vácuo por 5 min. Em seguida o sedimento foi ressuspendido em 2 µL de água deionizada e esterilizada e misturado com 18 µL de células eletrocompetentes de *Escherichia coli* cepa DH5α, preparadas segundo procedimento descrito por Sambrook e Russel (2001).

As células de *E. coli* foram transformadas com o produto da reação de ligação utilizando-se eletroporador (Cell-Porator *E. coli* Pulse, Life Technologies). Após o choque elétrico, as células foram colocadas em 1 mL de meio de cultura líquido LB e mantidas sob agitação a 37 °C durante 60 min. Em seguida a cultura foi centrifugada (1 min, 12.000 g), 800 µL do sobrenadante foram descartados e as células ressuspensas em 200 µL do meio restante, sendo plaqueadas em meio sólido LB contendo ampicilina (100 mg/L), X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosídeo) e IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo – indutor do *operon* Lac de *E. coli*). As culturas foram mantidas a 37 °C por 15 horas para o crescimento das colônias bacterianas.

A presença do antibiótico no meio de cultura permite apenas o crescimento das células transformadas contendo o vetor. Células transformadas contendo apenas o vetor sem o inserto formam colônias de coloração azul, resultante da reação da enzima β-galactosidase com o substrato X-Gal, permitindo assim sua identificação.

Após o período de incubação, 16 colônias brancas de cada placa contendo transformantes com segmentos dos genes *tcdA*, *tccC* e *mcf* foram selecionadas para extração de plasmídeos e seqüenciamento dos insertos.

3.2.5 - Extração dos plasmídeos dos clones obtidos

Os plasmídeos foram extraídos das células bacterianas através do método de fervura (Sambrook e Russel, 2001).

Para a extração foram utilizadas culturas bacterianas com 12 horas de crescimento em 37 °C sob agitação. Aliquotas de 1,5 mL de cultura foram centrifugadas por 1 min, em temperatura ambiente, 12.000 g e o sobrenadante foi ressuspensado em 350 µL de tampão STET (100 mM Tris pH 8,0, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5% Triton X-100). Acrescentou-se 25 µL de lisozima (10 g/mL em 10 mM de TrisHCl pH 8.0) e a suspensão foi agitada e submersa em água fervente por 40 seg. Em seguida a suspensão foi centrifugada por 10 min em temperatura ambiente, 12.000 g e o pellet formado foi removido com o auxílio de um palito de dente esterilizado. A precipitação foi feita através da adição de 40 µL de acetato

de sódio 2,5 M (pH 5,2), 450 μ L de isopropanol e centrifugação por 5 min, 12.000 g a 4 °C. O precipitado foi lavado com etanol 70 %, seco e ressuspendido em 30 μ L de TE pH 8,0, com RNase A (20 μ g/mL).

O seqüenciamento dos insertos foi realizado conforme descrito em 3.1.2, porém utilizando-se os *primers* baseados no vetor, T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG -3') e SP6 (5'-ATTTAGGTGACACTATAG -3').

3.2.6 – Amplificação dos segmentos iniciais e finais dos genes *tcdA1* e *tcdA4* de *P. luminescens* IB01

As seqüências obtidas para a região central dos genes *tcdA* mostraram grande semelhança com as dos genes correspondentes da linhagem W14 de *P. luminescens* que estão depositadas no GenBank. Com base nestas seqüências obtidas, foram desenhados os *primers* *tcdA1-F* (5'-ATGAAYKMGYCTGTAAAGAG-3'), *tcdA4-F* (5'-ATGAACTCATACGTGAAAGAG-3'), *tcdA-R2* (5'-GYGCYTGARTACTGGCTTG-3'), *tcdA1-R* (5'-TTATTTAATGGTGTAGCGAAT -3'), *tcdA4-R* (5'-TTATTTCGAGRATAGTGTAACG-3') e *tcdA-F2* (5'-AATACBCTATTYGCYCGCCA-3'), para a obtenção dos segmentos iniciais e finais destes genes. A Figura 4 mostra a posição destes *primers* nos genes *tcdA1* e *tcdA4*.

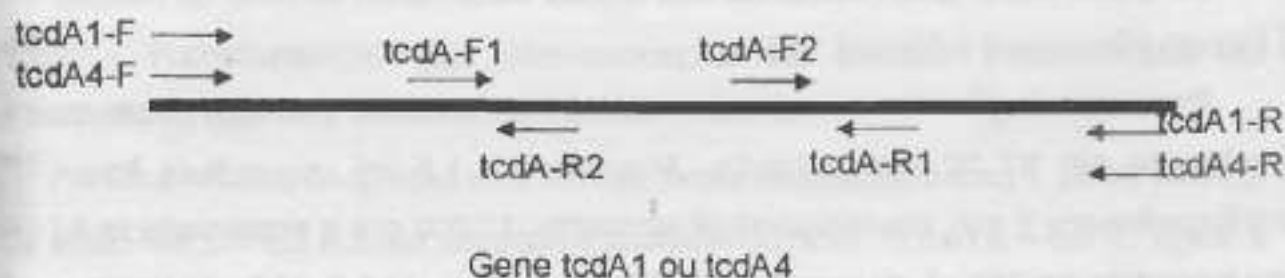


Figura 4 - Posição dos *primers* desenhados para a amplificação dos segmentos iniciais e finais dos genes *tcdA1* e *tcdA4*.

A reação de amplificação foi feita utilizando-se o seguinte programa: 94 °C por 2 min, seguido de 40 ciclos de 94 °C por 30 s, 56 °C por 30 s, 72 °C por 2 min e 45 s e extensão final a 72 °C por 4 min.

Os produtos amplificados foram clonados no vetor pGEM-T e parcialmente seqüenciados.

Uma vez que os segmentos iniciais e finais dos genes *tcdA1* e *tcdA4* do isolado IB01 foram amplificados com sucesso, foi verificada a possibilidade de amplificação destes genes inteiros utilizando-se os pares de *primers* *tcdA1-F* + *tcdA1-R* e *tcdA4-F* + *tcdA4-R* e o kit Expand Long Template PCR System (Roche Molecular Biochemicals).

Os genes *tcdA1-IB01* e *tcdA4-IB01* foram clonados no vetor pGEM-T Easy (Promega) originando os vetores *tcdA1/pGEM-TE* e *tcdA4/pGEM-TE*.

Os procedimentos de amplificação, clonagem, transformação e seqüenciamento foram realizados conforme descrito nos itens anteriores.

3.3 - SEQÜENCIAMENTO DOS GENES *tcdA1* E *tcdA4* DE *P. luminescens* IB01 ATRAVÉS DA CONSTRUÇÃO DE UMA SUB-BIBLIOTECA DE PLASMÍDEOS

Clones contendo cada um dos genes (*tcdA1-IB01* e *tcdA4-IB01*) foram cultivados em 30 mL de meio LB por 12 horas a 37 °C sob agitação e a extração dos plasmídeos foi realizada através do QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Califórnia, USA). Os plasmídeos purificados foram então fragmentados em nebulizador propelido com nitrogênio gasoso e depois sofreram tratamento com a enzima Mung Bean nuclease (New England Biolabs) (20 µL DNA nebulizado, 3 µL tampão 10x, 1 µL Mung Bean nuclease, 6 µL água destilada – 30 min, 30 °C) para a obtenção de extremidades retas. Os produtos obtidos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,8 %, do qual se extraiu um segmento contendo fragmentos de tamanho variando entre 500 e 1.000 pb.

Após purificação com o kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen), os fragmentos foram clonados no vetor pGEM-3Zf+ previamente digerido com a enzima *SmaI* e

desfosforilado. A reação de ligação consistiu de 5 μ L tampão 2X, 0,5 μ L pGEM 3Zf+ linearizado, 3,5 μ L DNA tratado e 1 μ L DNA ligase (3 U/ μ L) e a incubação foi realizada por 12 h à 16 °C. Foram selecionados 96 clones com fragmentos de cada um dos genes para seqüenciamento. Inicialmente, o seqüenciamento dos clones foi realizado apenas em um sentido empregando o *primer* T7. Após a análise dos resultados, quando necessário foi realizado o seqüenciamento da extremidade oposta do clone utilizando-se o *primer* SP6.

3.4 - CLONAGEM DO GENE *tcdA1-IB01* JUNTO À SEQÜÊNCIA TIR NO VETOR pGEM-T Easy

A seqüência TIR do vetor pGreenTIR (Miller & Lindow, 1997) foi introduzida junto ao gene *tcdA1-IB01* para aumentar sua expressão. Esta seqüência é composta por uma região consenso Shine-Dalgarno com uma região espaçadora que minimiza a formação de estruturas secundárias no RNA e uma seqüência acentuadora de tradução do gene 10 do fago T7 (Miller & Lindow, 1997). As etapas seguidas para a introdução da seqüência TIR precedendo o gene *tcdA1-IB01* estão representadas na Figura 5.

3.4.1 - Transferência do segmento *SacI* do pGREEN-TIR para o pGEM-T Easy.

Os plasmídeos pGreenTIR e pGEM-T Easy foram digeridos com a enzima *SacI* (Invitrogen) e o produto de digestão do pGEM-T Easy foi tratado com 1 μ L de fosfatase alcalina por 5 min a 50 °C para impedir o fechamento do vetor.

Os produtos de digestão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,8 % a partir do qual foram extraídas e purificadas as bandas correspondentes ao pGEM-T Easy linearizado e ao fragmento *SacI*-TIR-gfp de aproximadamente 800 pb.

O fragmento *SacI*-TIR-gfp foi ligado ao pGEM-T Easy dando origem ao vetor TIRgfp/pGEM-TE o qual foi introduzido em *E. coli*. As colônias transformadas foram identificadas através da sua fluorescência verde sob luz UV. Os plasmídeos

contendo os insertos foram extraídos pela técnica de fervura e foi realizada digestão com as enzimas *SacI* e *NdeI* para confirmação da presença do inserto.

3.4.2 - Introdução de sítios de restrição *EcoRI* e *NdeI* no início do gene *tcdA1-IB01*

Um segmento inicial de aproximadamente 2,5 kb do gene *tcdA1-IB01* foi amplificado utilizando-se os primers *tcdA1-EcoNde* (5'-AAGAATTCATATGAACGAGTCTGTAAAAGAG-3') e *tcdA-R2* para a introdução de sítios para as enzimas de restrição *EcoRI* e *NdeI*.

A reação de amplificação foi realizada com o Expand Long Template System (Roche Molecular Biochemicals) utilizando-se o seguinte programa: 94 °C por 2 min, seguido de 94 °C por 10 s, 54 °C por 30 s, 68 °C por 2 min (10 ciclos) e 94 °C por 10 s, 54 °C por 30 s, 68 °C por 2 min + 20 s por ciclo (20 ciclos).

O produto da amplificação foi clonado no vetor pGEM-TEasy produzindo o vetor *EcoNde-tcdA1/pGEM-TE*.

3.4.3 – Clonagem do fragmento *Nde-tcdA1* no vetor *TIRgfp/pGEM-TE*

O vetor *TIRgfp/pGEM-TE* e o vetor *EcoNde-tcdA1/pGEM-TE* foram digeridos com a enzima de restrição *NdeI*. O produto de digestão do *TIRgfp/pGEM-TE* foi desfosforilado para impedir o fechamento do vetor.

Os produtos das digestões foram purificados através de eletroforese em gel de agarose 0,8 %. Foram extraídas do gel uma banda de aproximadamente 1.200 pb produzida pela digestão do *EcoNde-tcdA1/pGEM-TE* e uma banda correspondente ao *TIR/pGEM-TE*, do qual foi removido o gene *gfp*, de aproximadamente 3.000 pb. Estes fragmentos foram ligados entre si dando origem ao vetor *TIR-tcdA1-Nde/pGEM-TE*.

A verificação da presença do segmento *TIR-tcdA1-Nde*, na orientação correta, foi realizada através da técnica de PCR direto de colônias bacterianas. Para a reação de amplificação foram utilizados o primer *tcdA1-Nde* (5'-CATATGAACGAGTCTGTAAAAGAG-3') e o primer T7 do vetor.

3.4.4 – Clonagem do segmento *Bgl*II-*Sph*I do gene *tcdA1*-IB01 no vetor TIR-*tcdA1*-Nde/pGEM-TE

O vetor TIR-*tcdA1*-Nde/pGEM-TE (clone 8) e o vetor *tcdA1*/pGEM-TE (clone 1) foram digeridos com as enzimas de restrição *Bgl*II e *Sph*I.

Os produtos de digestão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,8 %. Foram extraídas do gel uma banda de aproximadamente 7.100 pb produzida pela digestão do *tcdA1*/pGEM-TE e uma banda de aproximadamente 3.500 pb oriunda do TIR-*tcdA1*-Nde/pGEM-TE. Estes fragmentos foram ligados entre si dando origem ao vetor TIR-*tcdA1*/pGEM-TE, o qual foi introduzido em *E. coli*. As colônias transformadas foram submetidas à técnica de fervura para a extração dos plasmídeos os quais foram verificados quanto à correção do inserto, através de digestão com a enzima *Hind*III.

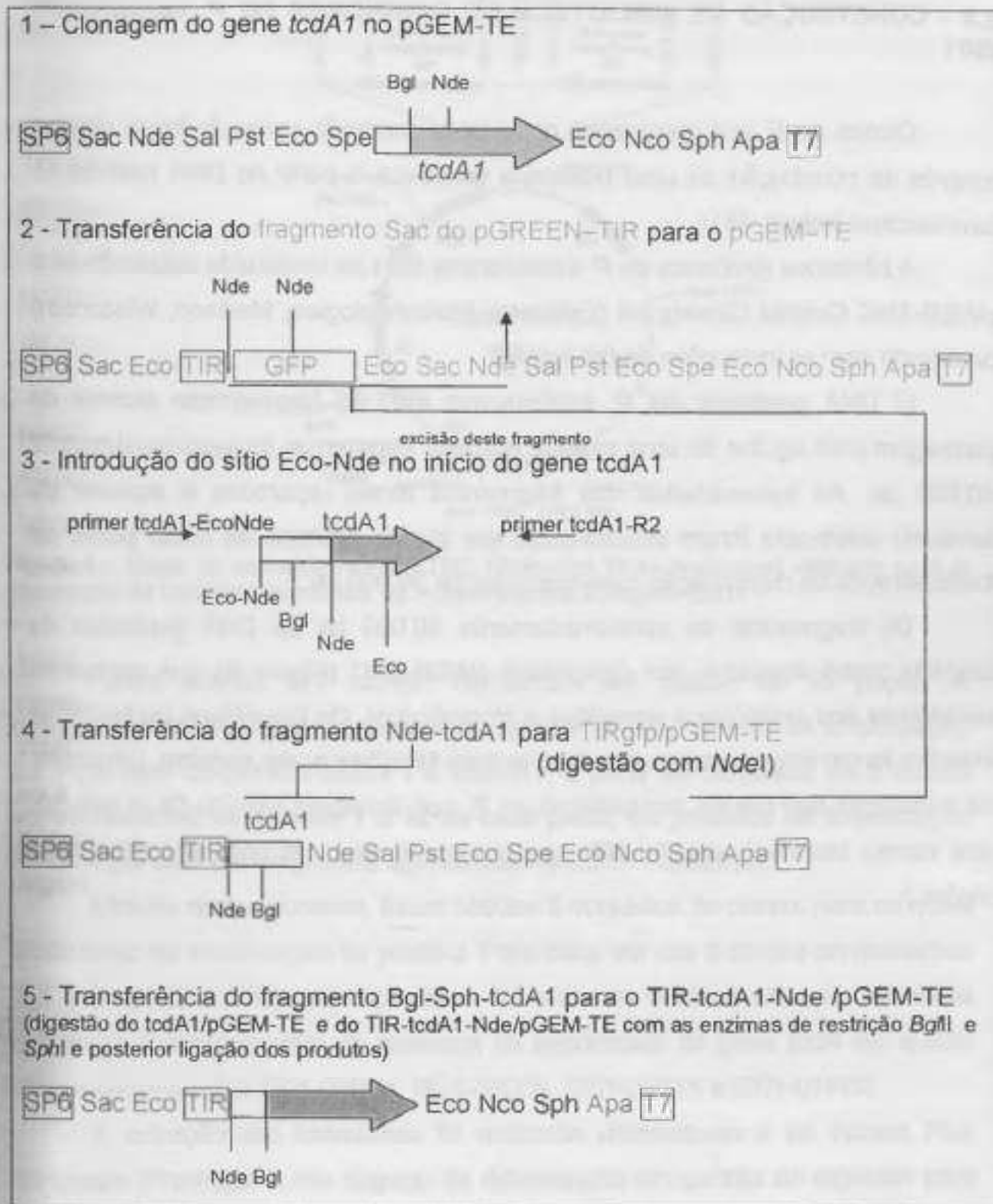


Figura 5 - Etapas do processo de clonagem do gene *tcdA1* de *P. luminescens* IB01 junto à sequência TIR no vetor pGEM-T Easy.

3.5 - CONSTRUÇÃO DE BIBLIOTECA DE COSMÍDEOS DE *P. luminescens* IB01

Clones de *E. coli* carregando cosmídeos contendo genes *lc* foram obtidos através da construção de uma biblioteca genômica a partir do DNA total de *P. luminescens* isolado IB01.

A biblioteca genômica de *P. luminescens* IB01 foi construída utilizando-se o pWEB-TNC Cosmid Cloning Kit (Epicentre Biotechnologies, Madison, Wisconsin) de acordo com as instruções do fabricante.

O DNA genômico de *P. luminescens* IB01 foi fragmentado através da passagem pela agulha de uma seringa gerando fragmentos de aproximadamente 40.000 pb. As extremidades dos fragmentos foram reparadas e aqueles de tamanho adequado foram selecionados em gel de agarose de baixo ponto de fusão através da comparação com marcador de 36.000 pb.

Os fragmentos de aproximadamente 40.000 pb do DNA genômico da bactéria foram inseridos em cosmídeos pWEB-TNC (Figura 6) que apresenta resistência aos antibióticos ampicilina e cloranfenicol. Os cosmídeos contendo os insertos foram empacotados usando o extrato MaxPlax e, em seguida, procedeu-se a infecção das células hospedeiras de *E. coli*, linhagem EPI100-T1. A seleção dos clones transformados foi feita em placas de meio LB com ampicilina (100 mg/mL).

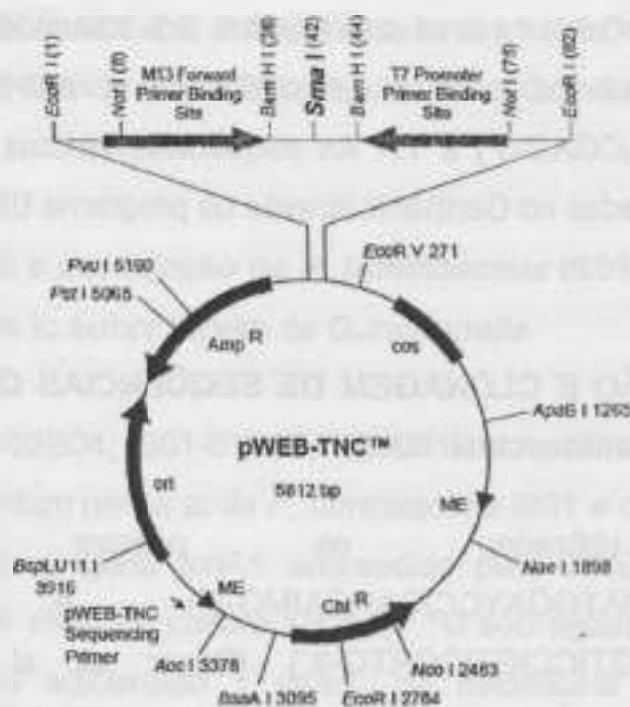


Figura 6 - Mapa do cosmídeo pWEB-TNC (Epicentre Biotechnologies) utilizado para a construção de biblioteca genômica de *P. luminescens* linhagem IB01.

Foram obtidos 272 clones, distribuídos em placas de 96 poços. A identificação dos cosmídeos contendo genes *tcdA* foi feita através da amplificação por PCR com os *primers* *tcdA*-F1 e *tcdA*-R1, a partir de conjuntos de 8 clones correspondentes às colunas 1 a 12 de cada placa. Os produtos de amplificação gerados por este par de *primers* apresentam de 2.230 a 2.966 pb.

Através deste processo, foram obtidos 5 conjuntos de clones para os quais o resultado da amplificação foi positivo. Para cada um dos 8 clones componentes dos 5 conjuntos considerados positivos, foi realizada uma amplificação individual que levou à determinação da presença de seqüências do gene *tcdA* em quatro clones denominados IB01-02B04, IB01-02D08, IB01-01D11 e IB01-01F02.

A extração dos cosmídeos foi realizada utilizando-se o kit Wizard Plus Minipreps (Promega) e em seguida foi determinado um padrão de digestão para cada um dos clones através da utilização das enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III. Este par de enzimas libera o inserto e permite que o vetor permaneça quase intacto uma vez que os sítios de restrição para a enzima *Bam*HI encontram-se nas posições 36 e 44 do vetor e para a enzima *Hind*III apenas na posição 113.

Os segmentos inicial e final dos insertos dos cosmídeos contendo genes *tcdA* foram seqüenciados com a utilização dos *primers* WEB-M13-F (5'-GGTTTTCCCAGTCACGAC-3') e T7. As seqüências obtidas foram comparadas com aquelas depositadas no GenBank através do programa BLAST-n.

3.6 – AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM DE SEQÜÊNCIAS CONSERVADAS DE GENES *pks* DE *P. luminescens* IB01

Foram utilizados os *primers* KS-F (5'-MGIGARGCIHWISMIATGGAYCCICARCAIMG-3') e KS-R (5'-GGRTCICCIARISWIGTICCIIGTICCRTG-3') (Beyer et al., 1999) para a amplificação de segmentos conservados de genes codificadores de sintases de policetídeos (genes *pks*) de *P. luminescens* a partir do DNA total da bactéria obtido conforme descrito no item 3.2.1. Os *primers* foram cedidos pela Dra. Marli de Fátima Fiore do CENA/USP- Piracicaba.

A amplificação foi realizada utilizando-se o programa: 94 °C por 2 min, seguido de 5 ciclos de 94 °C por 1 min, 45 °C por 1 min, 72 °C por 1 min e 30 ciclos de 94 °C por 30 s, 50 °C por 1 min, 72 °C por 4 min e extensão final a 72 °C por 15 min.

O produto da amplificação por PCR, de aproximadamente 720 pb, foi clonado em vetor pGEM-T Easy e células de *E. coli* DH10B foram transformadas por eletroporação. Dezesesseis colônias foram submetidas a PCR empregando-se os *primers* T7 e SP6, para identificação daquelas que continham o inserto. Destas, 10 continham insertos do tamanho esperado e foram submetidas ao seqüenciamento.

3.7 – TESTES DE TOXICIDADE DE *P. luminescens* IB01 E DOS CLONES DE *E. coli* CONTENDO GENES *tc* CONTRA LARVAS DOS INSETOS *Galleria mellonella* E *Diatraea saccharalis*

3.7.1 – Toxicidade oral e por injeção de *P. luminescens* IB01 e dos clones de *E. coli* contendo genes *tc* sobre larvas de *G. mellonella*

Os clones IB01-02B04, IB01-01D08, IB01-01D11 e IB01-01F02, contendo cosmídeos que apresentam genes *tc* de *P. luminescens* IB01 e o clone TIR-tcdA1-1 de *E. coli* contendo o gene *tcdA1* antecedido pela seqüência TIR foram cultivados em 2 mL de meio de cultura LB a 37 °C sob agitação por 18 horas. Após este período foi adicionado 1 µg/mL de mitomicina às culturas que permaneceram por mais 3 h nas mesmas condições. O isolado IB01 de *P. luminescens* foi cultivado em 2 mL de meio de cultura LB a 25 °C sob agitação por 21 horas. Como controle negativo do experimento foi utilizada cultura de *E. coli* não transformada acrescido de mitomicina (1 µg/mL) nas mesmas condições descritas.

Cinco larvas de *G. mellonella* de aproximadamente 1,5 cm foram pesadas e introduzidas em frascos de vidro de 6,0 cm de diâmetro por 12,0 cm de altura esterilizados e receberam 1,0 g de dieta (cera de abelha, 475 g; leite em pó desnatado, 46 g; levedura de cerveja, 188 g; fubá de milho, 385 g; soja, 160 g; glicerina 416 mL; formaldeído 40%, 1,5 mL; água destilada, 300 mL) acrescidos de 200 µL dos tratamentos e controle. Os frascos foram tampados com tela metálica e permaneceram no escuro a 25 °C. Dois dias após o início do experimento, as larvas receberam nova porção de 1,0 g de dieta sem tratamento. Foram realizadas 3 repetições para cada tratamento.

Após um período de 4 dias, as larvas sobreviventes foram pesadas novamente para a avaliação do ganho de peso no período.

A porcentagem do ganho de peso foi calculada com base no aumento de peso por grupo de 5 larvas no final do experimento em relação ao peso inicial.

Os experimentos para determinação de toxicidade através de injeção na hemocela das larvas foram realizados com o sobrenadante das culturas bacterianas. O isolado IB01, *E. coli*, e os clones IB01-02B04, IB01-01D08, IB01-01D11, IB01-01F02 e TIR-tcdA1-1 foram cultivados conforme descrito acima e em seguida foram centrifugados por 1 min, 10.000 g para a decantação das células. Cinco microlitros do sobrenadante de cada cultura foram injetados com seringa Hamilton (10 µL) na região ventral posterior de cada larva. Foram utilizadas 5 larvas de aproximadamente 1,5 cm por tratamento que foram tratadas e colocadas em placas de Petri plásticas estéreis e receberam e receberam 1,0 g da dieta descrita acima. Permaneceram no escuro a 25 °C e a avaliação da mortalidade foi realizada após um período de 48 horas.

3.7.2 - Toxicidade oral e por injeção de *P. luminescens* IB01 e dos clones de *E. coli* contendo genes *tc* sobre larvas de *D. saccharalis*

Para a determinação da toxicidade oral e por injeção sobre larvas de *Diatraea saccharalis* foram utilizados os mesmos tratamentos e controle descritos no item 3.7.1.

Para os testes de toxicidade oral, cinco larvas de *D. saccharalis* de aproximadamente 1,5 cm foram pesadas e introduzidas em frascos de vidro de 6,0 cm de diâmetro por 12,0 cm de altura esterilizados e receberam como dieta frações de colmo de cana-de-açúcar de 2,0 g embebidos em 200 µL dos tratamentos e controles. Os frascos foram tampados com tela metálica e permaneceram no escuro a 25 °C. Foram realizadas três repetições de cada tratamento. As larvas receberam nova porção de colmo de cana-de-açúcar sem tratamento no segundo dia do experimento e foram pesadas após um período de 4 dias.

Os experimentos para determinação de toxicidade através de injeção na hemocela das larvas foram realizados com o sobrenadante das culturas bacterianas. Os clones foram cultivados conforme descrito acima e foram centrifugados por 1 min, 10.000 g para a decantação das células. Três microlitros

do sobrenadante de cada cultura foram injetados com seringa Hamilton (10 μ L) na região ventral posterior de cada larva. Foram utilizadas 5 larvas de aproximadamente 1,5 cm por tratamento que foram tratadas e colocadas em placas de Petri plásticas estéreis

e receberam como dieta frações de colmo de cana-de-açúcar de 2,0 g. Foram realizadas três repetições de cada tratamento. As larvas permaneceram no escuro a 25 °C e a avaliação da mortalidade foi realizada após um período de 48 horas.

As larvas de *G. mellonella* foram cedidas pelo Dr. Luis Garrigós Leite, pesquisador da Seção de Controle Biológico do Instituto Biológico de Campinas onde também foi preparada a dieta. Larvas de *D. saccharalis* foram cedidas pelo Dr. Luis Garrigós Leite e pelo biólogo Heraldo Negri de Oliveira do Departamento de Entomologia da ESALQ/USP. Os colmos de cana-de-açúcar foram coletados no campo experimental do Instituto Biológico de São Paulo:

4. RESULTADOS

4.1 - OBTENÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DO ISOLADO IB01 DE *Photorhabdus luminescens*

A identificação do isolado bacteriano IB01, obtido a partir de larvas do nematóide *Heterorhabditis* sp no Instituto Biológico de Campinas, foi realizada através do seqüenciamento do rDNA 16S. A comparação da seqüência obtida com as seqüências do mesmo gene da espécie *Photorhabdus luminescens* depositadas em banco de dados internacional mostrou 99,2 % de identidade com *P. luminescens* subsp. *akhurstii* linhagem IND (número de acesso: AY278643), 98,6 % com *P. l.* subsp. *akhurstii* linhagem W14 (número de acesso: AY278642), 97,7 % com *P. luminescens* subsp. *laumondii* linhagem TT01 (número de acesso: AY278646), 96,8 % com *P. l.* subsp. *kayaïi* (número de acesso: AJ560631) e 96,6 % com *P. l.* subsp. *thraceaensis* (número de acesso: AJ560634). Com base nestes resultados o isolado IB01 foi identificado como pertencente à espécie *Photorhabdus luminescens* subsp. *akhurstii*.

4.2 - AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM DOS GENES *tcdA* DE *P. luminescens* IB01

O DNA total do isolado IB01 de *P. luminescens* foi eficientemente extraído das células da bactéria através do método do CTAB. Através de eletroforese em gel de agarose 0,8 % foi possível observar a presença de uma banda mais intensa característica de DNA cromossomal bacteriano. A amostra obtida apresentou concentração de 0,88 mg/mL.

Com a utilização de *primers* desenhados para regiões conservadas dos genes *tcdA* foram obtidos produtos de amplificação com tamanhos entre aproximadamente 2.200 a 2.900 pb. Após clonagem e seqüenciamento de 12 clones contendo os produtos amplificados por PCR, foi possível a obtenção de seqüências que quando comparadas com as seqüências depositadas em banco

de dados internacional se mostraram semelhantes aos genes *tcdA1*, *tcdA2*, *tcdA3* e *tcdA4* de *P. luminescens* subsp. *akhurstii* isolado W14. Conforme pode ser observado na Figura 7, a extremidade 5' do clone 09 apresentou maior similaridade ao gene *tcdA1* (96,6 % idêntico) e em menor escala ao gene *tcdA4* (73,8 %). O clone 06 apresentou maior similaridade ao gene *tcdA2* (92,7 %) e o clone 11 ao gene *tcdA3* (98,2 %). Quando analisada a extremidade 3' (Figura 8), verificou-se que o clone 09 tem maior similaridade ao gene *tcdA4* (79,3 %) do que ao gene *tcdA1* (59,3 %). O clone 06, apesar de ainda se mostrar mais semelhante ao gene *tcdA2*, apresentou nível de identidade bem menor (49,0 %) que sua extremidade 5', devido à presença de uma lacuna de 384 nucleotídeos. O clone 11 manteve em sua extremidade 3' uma maior similaridade ao gene *tcdA3* (98,0 %).

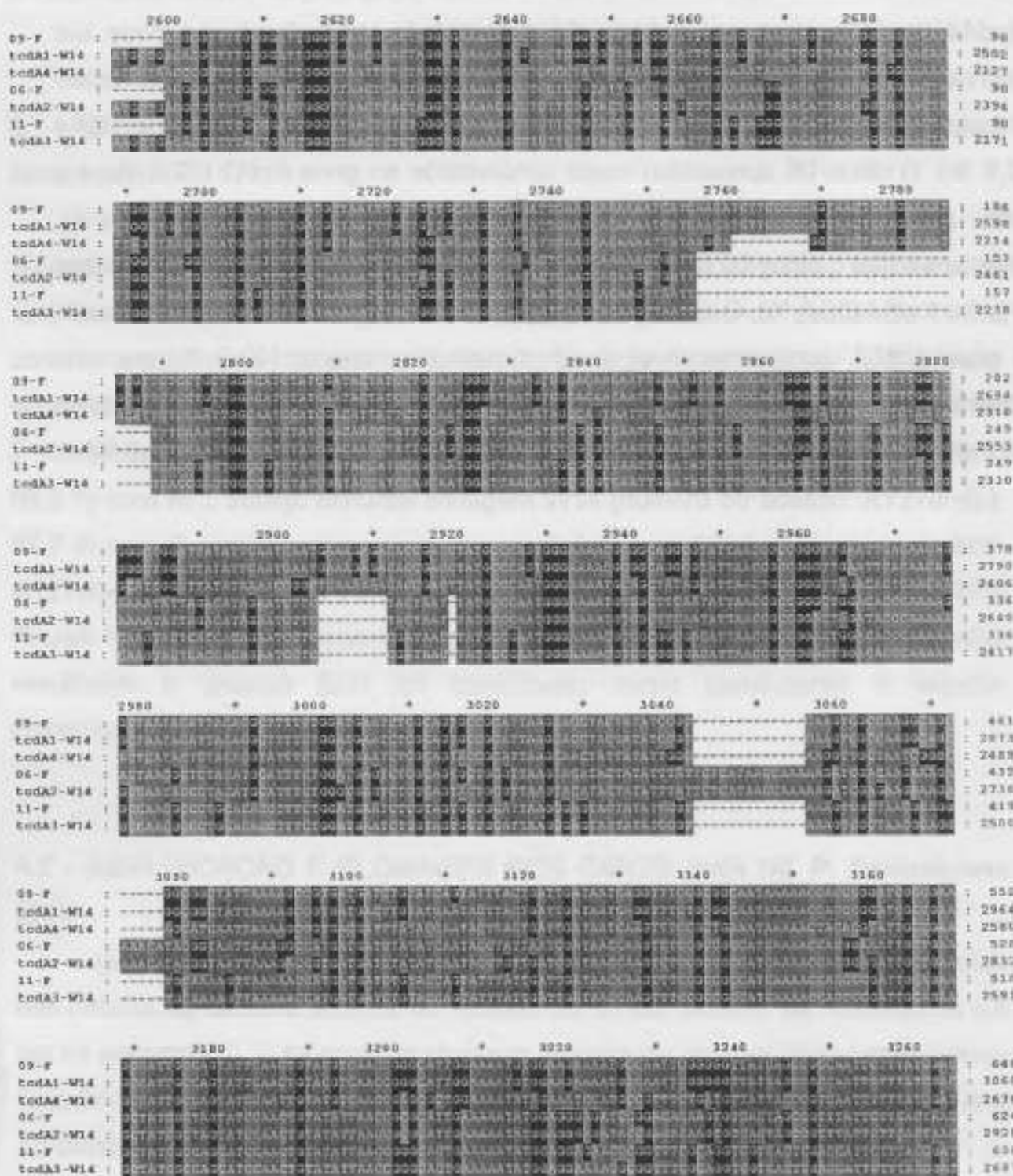


Figura 7. Alinhamento das seqüências nucleotídicas das extremidades 5' dos clones 09, 06 e 11, contendo genes *tcdA* de *P. luminescens* IB01, e seqüências de genes *tcdA* de *P. luminescens* W14.

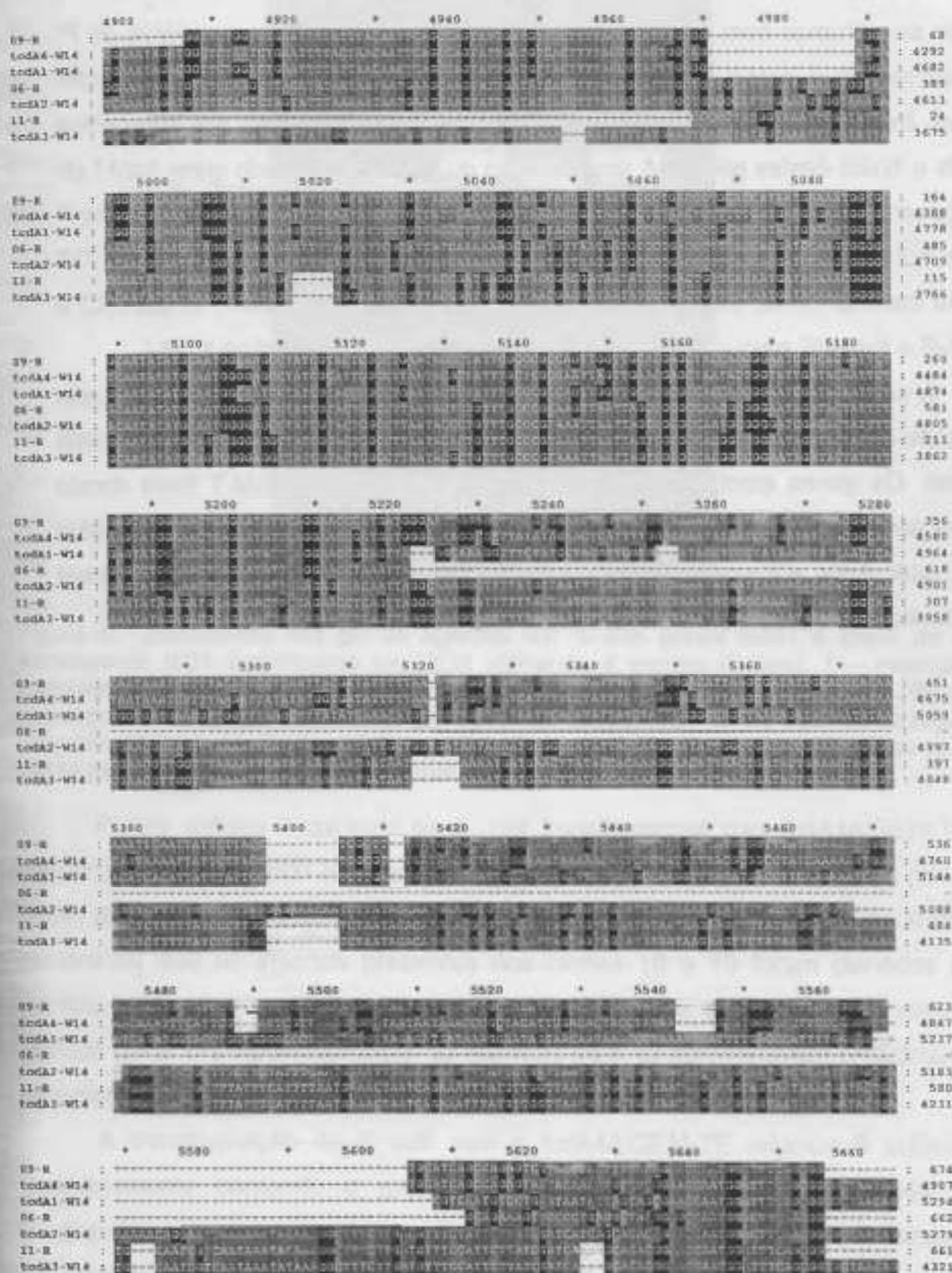


Figura 8 - Alinhamento das seqüências nucleotídicas das extremidades 3' dos clones 09, 06 e 11, contendo genes *tcdA* de *P. luminescens* IB01, e seqüências de genes *tcdA* de *P. luminescens* W14.

As seqüências obtidas para a região central dos genes *tcdA* mostraram grande semelhança com as dos genes correspondentes da linhagem W14 de *P. luminescens* que estão depositadas no GenBank. Com base nas seqüências obtidas, foram desenhados os *primers* que permitiram a obtenção dos segmentos iniciais e finais destes genes. A amplificação do início e do fim do gene *tcdA1* de IB01 foi obtida através da utilização respectivamente dos pares de *primers* *tcdA1-F* e *tcdA-R2* e *tcdA1-R* e *tcdA-F2*, com produtos de amplificação de 2.560 pb e 2.735 pb. Da mesma forma, foram utilizados os pares de *primers* *tcdA4-F* e *tcdA-R2* e *tcdA4-R* e *tcdA-F2* para amplificação dos segmentos inicial e final de *tcdA4*.

A amplificação dos genes *tcdA1* e *tcdA4* (Figura 9) completos foi alcançada utilizando-se os pares de *primers* *tcdA1-F/tcdA1-R* e *tcdA4-F/tcdA4-R* e a enzima Expand. Os genes amplificados foram clonados em vetor pGEM-T Easy dando origem aos plasmídeos *tcdA1/pGEM-TE* e *tcdA4/pGEM-TE* que foram introduzidos em *E. coli*. Após a transformação foram obtidas várias colônias das quais foram selecionadas 24, para cada um dos insertos, para a extração dos plasmídeos.



Figura 9 - Eletroforese em gel de agarose 0,8 % dos genes *tcdA1* e *tcdA4* de *P. luminescens* IB01 amplificados por PCR utilizando a enzima Expand. 1 - marcador molecular 1 Kb DNA ladder (Invitrogen). 2 e 3 - bandas de aproximadamente 7.500 pb correspondentes ao gene *tcdA1* (concentração do tampão 1,75 mM e 2,25mM de $MgCl_2$ respectivamente). 4 e 5 - banda de aproximadamente 7.500 pb correspondente ao gene *tcdA4* (concentração do tampão 1,75 mM e 2,25mM de $MgCl_2$ respectivamente).

Foram obtidas 4 colônias de *E. coli* transformadas com *tcdA1/pGEM-TE*, aparentemente contendo o inserto desejado. As extremidades 5' e 3' dos genes *tcdA1* destes clones foram seqüenciadas com os *primers* T7 e SP6. Os resultados mostraram que os insertos presentes nos clones 18 e 19 foram clonados no sentido inverso ao do gene *lacZ* do vetor (T7-SP6) e os clones 1 e 8 no mesmo sentido (SP6-T7). Aparentemente, as colônias 18 e 19 apresentaram crescimento reduzido e aspecto translúcido em comparação com as demais.

A transformação de *E. coli* com o *tcdA4/pGEM-TE* originou 8 colônias aparentemente contendo o gene inteiro, o que foi confirmado através do seqüenciamento das extremidades 5' e 3'. Os clones 1, 5, 11 e 12 foram clonados no sentido inverso ao do gene *lacZ* do vetor (T7-SP6) enquanto que os clones 2, 3, 7 e 9 apresentavam-se no mesmo sentido (SP6-T7). Não foram observadas diferenças nos aspectos das colônias destes clones.

4.3 - SEQUENCIAMENTO DOS GENES *tcdA1* E *tcdA4* DE *P. luminescens* IB01 ATRAVÉS DA CONSTRUÇÃO DE UMA SUB-BIBLIOTECA DE PLASMÍDEOS

O vetor pGEM-TE, no qual foi clonado o gene *tcdA1*, foi extraído a partir de uma colônia de *E. coli* (clone *tcdA1*-18) e o DNA foi fragmentado mecanicamente produzindo segmentos de aproximadamente 500 a 1000 pb, os quais foram clonados em pGEM-3Zf+. O mesmo procedimento foi realizado para o clone *tcdA4*-1.

Foram seqüenciados os insertos de 96 dos clones obtidos para cada um dos genes (*tcdA1* e *tcdA4*). As seqüências obtidas foram analisadas e processadas pelo programa Sequencher que resultou na obtenção das seqüências completas dos genes *tcdA1* e *tcdA4* do isolado IB01 de *P. luminescens* (Figuras 10 e 11). A montagem do gene *tcdA1*-IB contou com 63 "reads", resultando em um "contig" de 7.554 nucleotídeos codificando uma proteína de 2.517 aminoácidos. A montagem do gene *tcdA4*-IB contou com 86 "reads" resultando em um "contig" de 7.185 nucleotídeos codificando uma proteína de 2.394 aminoácidos.

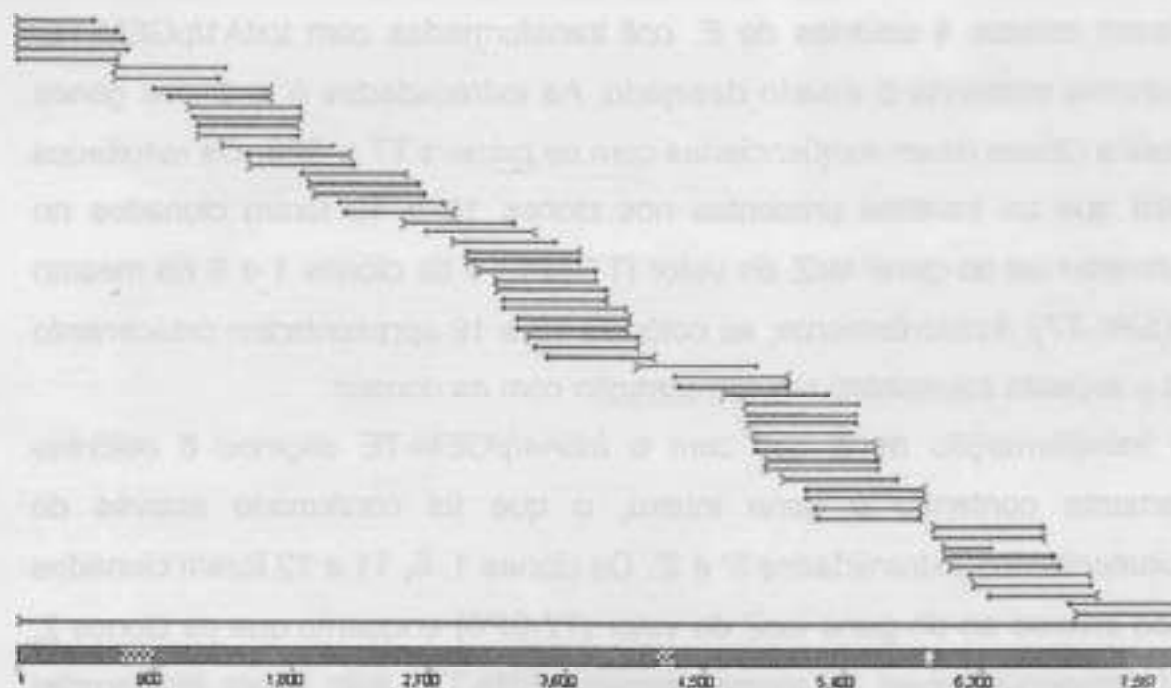


Figura 10 - Montagem da sub-biblioteca do clone *tcdA1*-18. As setas representam os insertos dos sub-clones seqüenciados.

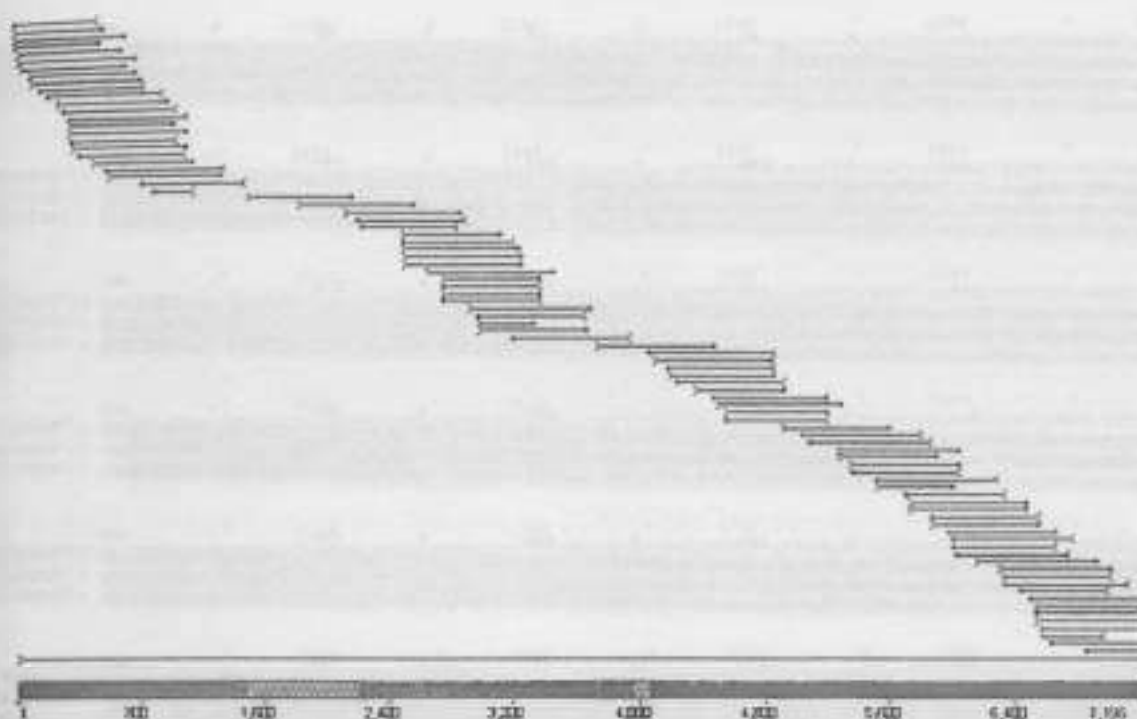


Figura 11 - Montagem da sub-biblioteca do clone tcdA4-1. As setas representam os insertos dos sub- clones seqüenciados.

A proteína TcdA1-IB01 apresentou identidade de 94,3 % com a proteína TcdA1-W14 e de 87,4 % com TcdA1-TT01 (Figura 12). Embora seja clara a maior semelhança entre TcdA1-IB01 e TcdA1-W14, há um pequeno trecho entre os aminoácidos 1636-1754 de TcdA1-IB01 em que se observa maior similaridade com TcdA4-W14 (Figura 13).

A proteína TcdA4-IB01 apresentou identidade de 90,3 % com a proteína TcdA4-W14 e de 86,2 % com a TcdA1-TT01 (Figura 14). Também há um pequeno trecho entre os aminoácidos 1505-1635 de TcdA4-IB01 em que se observa maior similaridade com TcdA2-W14 (Figura 15).

		20	40	60	80	100		
TcdA1-TT01	:	MNEVVEEFDVLESGCGFNCLEIISSEDFMETQGVSEALNWEASDLYEDAQQAQKIMHLEKRIEKRAMPQLQNAVYELALATPVEELIGYHICFSGKA					:	100
TcdA1-W14	:	MNEVVEEFDVLESGCGFNCLEIISSEDFMETQGVSEALNWEASDLYEDAQQAQKIMHLEKRIEKRAMPQLQNAVYELALATPVEELIGYHICFSGKA					:	100
TcdA1-1B	:	MNEVVEEFDVLESGCGFNCLEIISSEDFMETQGVSEALNWEASDLYEDAQQAQKIMHLEKRIEKRAMPQLQNAVYELALATPVEELIGYHICFSGKA					:	100
		120	140	160	180	200		
TcdA1-TT01	:	SQYVAGTVSGHFSVAAYLTELSTREARNLRASDQVYVLOTARPDLESMALDQQWOTELELYLLELHLLSEKITEKTECKLHWYFVWMLSTFRPSCATPY					:	200
TcdA1-W14	:	SQYVAGTVSGHFSVAAYLTELSTREARNLRASDQVYVLOTARPDLESMALDQQWOTELELYLLELHLLSEKITEKTECKLHWYFVWMLSTFRPSCATPY					:	200
TcdA1-1B	:	SQYVAGTVSGHFSVAAYLTELSTREARNLRASDQVYVLOTARPDLESMALDQQWOTELELYLLELHLLSEKITEKTECKLHWYFVWMLSTFRPSCATPY					:	200
		220	240	260	280	300		
TcdA1-TT01	:	EDAVERNYSVTQLQQPCLEGLHASPATAGLMBGASLIGIMASISPELPMLEKTEKTEGMAKELFKENFGNIKPASLAMPKYLKRYNMLDQKELDQFSGKA					:	300
TcdA1-W14	:	EDAVERNYSVTQLQQPCLEGLHASPATAGLMBGASLIGIMASISPELPMLEKTEKTEGMAKELFKENFGNIKPASLAMPKYLKRYNMLDQKELDQFSGKA					:	300
TcdA1-1B	:	EDAVERNYSVTQLQQPCLEGLHASPATAGLMBGASLIGIMASISPELPMLEKTEKTEGMAKELFKENFGNIKPASLAMPKYLKRYNMLDQKELDQFSGKA					:	300
		320	340	360	380	400		
TcdA1-TT01	:	SNFQQEYSHMGLITPPVNSDGTVYVRIETEKYTMKQMDVLELFFGGENYRLELYKTEYDASVLSLAKRRELELRYEGLAPQVNIETSAKITLNTA					:	400
TcdA1-W14	:	SNFQQEYSHMGLITPPVNSDGTVYVRIETEKYTMKQMDVLELFFGGENYRLELYKTEYDASVLSLAKRRELELRYEGLAPQVNIETSAKITLNTA					:	400
TcdA1-1B	:	SNFQQEYSHMGLITPPVNSDGTVYVRIETEKYTMKQMDVLELFFGGENYRLELYKTEYDASVLSLAKRRELELRYEGLAPQVNIETSAKITLNTA					:	400
		420	440	460	480	500		
TcdA1-TT01	:	DISQFFETGLTRVLPDQWYAAANETVKEENQYVLLKMKATELDRATELEPTILEGIVRSVHQGLDINTDVLGKVEVETRYKQKSTDAKTEALDGN					:	500
TcdA1-W14	:	DISQFFETGLTRVLPDQWYAAANETVKEENQYVLLKMKATELDRATELEPTILEGIVRSVHQGLDINTDVLGKVEVETRYKQKSTDAKTEALDGN					:	500
TcdA1-1B	:	DISQFFETGLTRVLPDQWYAAANETVKEENQYVLLKMKATELDRATELEPTILEGIVRSVHQGLDINTDVLGKVEVETRYKQKSTDAKTEALDGN					:	500
		520	540	560	580	600		
TcdA1-TT01	:	ALISQKATYVWQTSQDRHLPHTFLMQQYFETGCKEIDMPSDNDDEWETLEKRAFNDKNSLFLKSTENHKKDGIKNNLEDSNLYIGFLACIHQI					:	600
TcdA1-W14	:	ALISQKATYVWQTSQDRHLPHTFLMQQYFETGCKEIDMPSDNDDEWETLEKRAFNDKNSLFLKSTENHKKDGIKNNLEDSNLYIGFLACIHQI					:	600
TcdA1-1B	:	ALISQKATYVWQTSQDRHLPHTFLMQQYFETGCKEIDMPSDNDDEWETLEKRAFNDKNSLFLKSTENHKKDGIKNNLEDSNLYIGFLACIHQI					:	600
		620	640	660	680	700		
TcdA1-TT01	:	YIDKDLLLVAVGCKTNLGAISDQATLLEKIMPTITCKLETQEMSVQLFVHTSYAVHTLYPEIKMLDTPVYNGLOGFQKXKADLLENHAPYIAATL					:	700
TcdA1-W14	:	YIDKDLLLVAVGCKTNLGAISDQATLLEKIMPTITCKLETQEMSVQLFVHTSYAVHTLYPEIKMLDTPVYNGLOGFQKXKADLLENHAPYIAATL					:	700
TcdA1-1B	:	YIDKDLLLVAVGCKTNLGAISDQATLLEKIMPTITCKLETQEMSVQLFVHTSYAVHTLYPEIKMLDTPVYNGLOGFQKXKADLLENHAPYIAATL					:	700
		720	740	760	780	800		
TcdA1-TT01	:	QLSESNVARRVLSMADLQFGDCAATAEKFNWIMATYTFPGLSEAVDHEKIVQSCQAIADCKMUYNSDGMKARFLFMTYPERGTSLGAAPTNOKLE					:	800
TcdA1-W14	:	QLSESNVARRVLSMADLQFGDCAATAEKFNWIMATYTFPGLSEAVDHEKIVQSCQAIADCKMUYNSDGMKARFLFMTYPERGTSLGAAPTNOKLE					:	800
TcdA1-1B	:	QLSESNVARRVLSMADLQFGDCAATAEKFNWIMATYTFPGLSEAVDHEKIVQSCQAIADCKMUYNSDGMKARFLFMTYPERGTSLGAAPTNOKLE					:	800
		820	840	860	880	900		
TcdA1-TT01	:	LIMHTRFADWNAIGKXASVLAAYEAMFLYAKQIADAMHLDANLLGASISQNHQDHPYPTPERATDQVYVHTLQWNNVADQDQWAPQGVSAALVGL					:	900
TcdA1-W14	:	LIMHTRFADWNAIGKXASVLAAYEAMFLYAKQIADAMHLDANLLGASISQNHQDHPYPTPERATDQVYVHTLQWNNVADQDQWAPQGVSAALVGL					:	900
TcdA1-1B	:	LIMHTRFADWNAIGKXASVLAAYEAMFLYAKQIADAMHLDANLLGASISQNHQDHPYPTPERATDQVYVHTLQWNNVADQDQWAPQGVSAALVGL					:	900
		920	940	960	980	1000		
TcdA1-TT01	:	DYIQDFQATPPTTYQWENAGILTAGIMDQADTLEAFLEKSSAKLSTYYTRQVAPFAAARDEHDDLYGVLLOMGRVAAATPTTIAEASASIQIYVWKA					:	1000
TcdA1-W14	:	DYIQDFQATPPTTYQWENAGILTAGIMDQADTLEAFLEKSSAKLSTYYTRQVAPFAAARDEHDDLYGVLLOMGRVAAATPTTIAEASASIQIYVWKA					:	1000
TcdA1-1B	:	DYIQDFQATPPTTYQWENAGILTAGIMDQADTLEAFLEKSSAKLSTYYTRQVAPFAAARDEHDDLYGVLLOMGRVAAATPTTIAEASASIQIYVWKA					:	1000
		1020	1040	1060	1080	1100		
TcdA1-TT01	:	LENVSEKAKHGGVLSHQEELDMDKEMRYETWAGVQGLVYVYENYIDHTIRTCQTEKMDALLQSVGQGLHETPVEDAFNGLSEFQVANGVYIATSDH					:	1100
TcdA1-W14	:	LENVSEKAKHGGVLSHQEELDMDKEMRYETWAGVQGLVYVYENYIDHTIRTCQTEKMDALLQSVGQGLHETPVEDAFNGLSEFQVANGVYIATSDH					:	1100
TcdA1-1B	:	LENVSEKAKHGGVLSHQEELDMDKEMRYETWAGVQGLVYVYENYIDHTIRTCQTEKMDALLQSVGQGLHETPVEDAFNGLSEFQVANGVYIATSDH					:	1100
		1120	1140	1160	1180	1200		
TcdA1-TT01	:	INDDGGLTYEIGLSETDAGEYVNRDSEKFCCKEAAANAKSEWKEIDCPIMPVYKTIKPYVYKSELYLWIKRQKELTKQTKNSKDCYQETDTRYSKEL					:	1200
TcdA1-W14	:	INDDGGLTYEIGLSETDAGEYVNRDSEKFCCKEAAANAKSEWKEIDCPIMPVYKTIKPYVYKSELYLWIKRQKELTKQTKNSKDCYQETDTRYSKEL					:	1200
TcdA1-1B	:	INDDGGLTYEIGLSETDAGEYVNRDSEKFCCKEAAANAKSEWKEIDCPIMPVYKTIKPYVYKSELYLWIKRQKELTKQTKNSKDCYQETDTRYSKEL					:	1200
		1220	1240	1260	1280	1300		
TcdA1-TT01	:	AKHRYDGMNTRITFDWNEKESLALAKHRRARGLKAGYQGLDYLWVETQDQTLSDYKMAHGGLYIFADHAKDMPHQDQWYVDMSTYQDFTNWS					:	1300
TcdA1-W14	:	AKHRYDGMNTRITFDWNEKESLALAKHRRARGLKAGYQGLDYLWVETQDQTLSDYKMAHGGLYIFADHAKDMPHQDQWYVDMSTYQDFTNWS					:	1300
TcdA1-1B	:	AKHRYDGMNTRITFDWNEKESLALAKHRRARGLKAGYQGLDYLWVETQDQTLSDYKMAHGGLYIFADHAKDMPHQDQWYVDMSTYQDFTNWS					:	1300

TcdA1-TT01	RVNDRYAEYELPSVNSRHHYGRDEYNLHWVWGGDIFRIYQASSDQKIRIIPKQKITTEGADICATNMQCHLIRKRETCRIGDKEIIVYTHLWVNTQWTSR	1320	1340	1360	1380	1400
TcdA1-W14	RVNDRYAEYELPSVNSRHHYGRDEYNLHWVWGGDIFRIYKAAASDQKIRIIPKQKITTEGADICATNMQCHLIRKRETCRIGDKEIIVYTHLWVNTQWTSR					1400
TcdA1-IB	RVNDRYAEYELPSVNSRHHYGRDEYNLHWVWGGDIFRIYKATASDQKIRIIPKQKITTEGADICATNMQCHLIRKRETCRIGDKEIIVYTHLWVNTQWTSR					1400
TcdA1-TT01	KYLLEFVYGYGQHTNHWVSGRLLPFRDQDIE-KVSVLELHWVGGELYREVTNDRHGFIIDTINQLPLFAGYLYWESHMNGFKIATQVYHVAEINTAIRRA	1420	1440	1460	1480	1500
TcdA1-W14	KLWYFVYGYGQHTNHWVSGRLLPFRDQDIEKVVLELHWVGGELYREVTNDRHGFIIDTINQLPLFAGYLYWESHMNGFKIATQVYHVAEINTAIRRA					1494
TcdA1-IB	KLWYFVYGYGQHTNHWVSGRLLPFRDQDIEKVVLELHWVGGELYREVTNDRHGFIIDTINQLPLFAGYLYWESHMNGFKIATQVYHVAEINTAIRRA					1494
TcdA1-TT01	KIQVTVKAGYKCKTETADKDVSVQPSDFDEMYTQFHTLKIYCTGLMFWNMIASIDVPTTALAKOGRHLCYKSPFIIVYHVKVSTIMALTLMHENGCAQYM	1520	1540	1560	1580	1600
TcdA1-W14	KVQITVYKAGYKCKTETADKDVSVQPSDFDEMYTQFHTLKIYCTGLMFWNMIASIDVPTTALAKOGRHLCYKSPFIIVYHVKVSTIMALTLMHENGCAQYM					1594
TcdA1-IB	KVQITVYKAGYKCKTETADKDVSVQPSDFDEMYTQFHTLKIYCTGLMFWNMIASIDVPTTALAKOGRHLCYKSPFIIVYHVKVSTIMALTLMHENGCAQYM					1594
TcdA1-TT01	DNQATKTRLAKLEAARQVVARATGGIDTILSNKYQNIQCFVSWH-DHFATATEPIYMSHAWGSENLKIRLGRKCKQOCANVYQGELETKW-GLINSEET	1620	1640	1660	1680	1700
TcdA1-W14	DNQYKTRLAKLEAARQVVARATGGIDTILSNKYQNIQCFVSWH-DHFATATEPIYMSHAWGSENLKIRLGRKCKQOCANVYQGELETKW-GLINSEET					1693
TcdA1-IB	DNQATKTRLAKLEAARQVVARATGGIDTILSNKYQNIQCFVSWH-DHFATATEPIYMSHAWGSENLKIRLGRKCKQOCANVYQGELETKW-GLINSEET					1693
TcdA1-TT01	ETIKERKSHKTEFVWVGRGDSKIITLVEYVSTNPTKIGCYWREKGTHTYQCTYFQKHNKDFIIEHQKT-EPNGFGKNSLTFWELFETTPHVAQGLLR	1720	1740	1760	1780	1800
TcdA1-W14	-----LDDVFLAQDIAKRYMTEKESFSDQVWGRHRYVQDQKIVTINPEETLTSFESVWVLMHISUEPNDVGGANSLYFWELFETTPHVAQGLLR					1793
TcdA1-IB	-----RFDDARGHNDLIVYAVYKQKQETNAIRFVKNQDSELAFTDTYKNGCTFGIAGASVWVPTT-EPNDFGGANSLYFWELFETTPHVAQGLLR					1784
TcdA1-TT01	EGNFEKAWMLKYNVPSQYIVNGQIQNYQWVYFLLEETVNSDPLDQVDFDAVAGQEDFWEKVEVETENRITLDDLARQDCAVNGSEHITLHAKRWYHQ	1820	1840	1860	1880	1900
TcdA1-W14	EGNFEKAWMLKYNVPSQYIVNGQIQNYQWVYFLLEETVNSDPLDQVDFDAVAGQEDFWEKVEVETENRITLDDLARQDCAVNGSEHITLHAKRWYHQ					1894
TcdA1-IB	EGNFEKAWMLKYNVPSQYIVNGQIQNYQWVYFLLEETVNSDPLDQVDFDAVAGQEDFWEKVEVETENRITLDDLARQDCAVNGSEHITLHAKRWYHQ					1894
TcdA1-TT01	ALNLSGDEPTLPLDITWNNRSLDRAADITTONAZASTIVALAQ--STAPLALNSANTLFDLFLPQIMVWMMHWQTLAQVYVLRNRLSDGGFLYLR	1920	1940	1960	1980	2000
TcdA1-W14	ALNLSGDEPTLPLDITWNNRSLDRAADITTONAZASTIVALAQ--STAPLALNSANTLFDLFLPQIMVWMMHWQTLAQVYVLRNRLSDGGFLYLR					1994
TcdA1-IB	ALNLSGDEPTLPLDITWNNRSLDRAADITTONAZASTIVALAQ--STAPLALNSANTLFDLFLPQIMVWMMHWQTLAQVYVLRNRLSDGGFLYLR					1994
TcdA1-TT01	YATPADKHALLSAAVATDQGGELFEZKSLKREHNLNARQHYSQLIQEGGTGQNTIEGQDREKRAAGQDQAEELIATNLSIQDETEELDVAETVL	2020	2040	2060	2080	2100
TcdA1-W14	YATPADKHALLSAAVATDQGGELFEZKSLKREHNLNARQHYSQLIQEGGTGQNTIEGQDREKRAAGQDQAEELIATNLSIQDETEELDVAETVL					2094
TcdA1-IB	YATPADKHALLSAAVATDQGGELFEZKSLKREHNLNARQHYSQLIQEGGTGQNTIEGQDREKRAAGQDQAEELIATNLSIQDETEELDVAETVL					2094
TcdA1-TT01	EKSKAGAQDHTDQYKLYDGHINAGENQAKMLKRAAGITTAVQATRLAGAAADLVPHITGFAAGGSRWGAIAEATGTYWREYANVMTKADKIQDSEY	2120	2140	2160	2180	2200
TcdA1-W14	EKSKAGAQDHTDQYKLYDGHINAGENQAKMLKRAAGITTAVQATRLAGAAADLVPHITGFAAGGSRWGAIAEATGTYWREYANVMTKADKIQDSEY					2194
TcdA1-IB	EKSKAGAQDHTDQYKLYDGHINAGENQAKMLKRAAGITTAVQATRLAGAAADLVPHITGFAAGGSRWGAIAEATGTYWREYANVMTKADKIQDSEY					2194
TcdA1-TT01	REKQEMKIQDNNIAEELAQGGQLESLVVRSEAAVQKTSIETQKQIQGQGLAFIQEIEENGLYHWLNGRSLAAITPQYDGLAVARCLMAQDATTNGLN	2220	2240	2260	2280	2300
TcdA1-W14	REKQEMKIQDNNIAEELAQGGQLESLVVRSEAAVQKTSIETQKQIQGQGLAFIQEIEENGLYHWLNGRSLAAITPQYDGLAVARCLMAQDATTNGLN					2294
TcdA1-IB	REKQEMKIQDNNIAEELAQGGQLESLVVRSEAAVQKTSIETQKQIQGQGLAFIQEIEENGLYHWLNGRSLAAITPQYDGLAVARCLMAQDATTNGLN					2294
TcdA1-TT01	ESASRETEKAWGCTYAGLLAGETLMLDILQMEDAKLRDRAALEVETVSEKWRASLPQDFGTEFLAQETLRLWVQDQAGCQHWLAFGAGTDYET	2320	2340	2360	2380	2400
TcdA1-W14	ESASRETEKAWGCTYAGLLAGETLMLDILQMEDAKLRDRAALEVETVSEKWRASLPQDFGTEFLAQETLRLWVQDQAGCQHWLAFGAGTDYET					2394
TcdA1-IB	ESASRETEKAWGCTYAGLLAGETLMLDILQMEDAKLRDRAALEVETVSEKWRASLPQDFGTEFLAQETLRLWVQDQAGCQHWLAFGAGTDYET					2394
TcdA1-TT01	SLQASVSLADSKTEKDTYASLCKIRRTKELDVTLPALGGPFDQVQRELSLQKAGLAKGCEALAVYTRDQDQGFQDFPHQGEYLFPEETALDQGTATLS	2420	2440	2460	2480	2500
TcdA1-W14	SLQASVSLADSKTEKDTYASLCKIRRTKELDVTLPALGGPFDQVQRELSLQKAGLAKGCEALAVYTRDQDQGFQDFPHQGEYLFPEETALDQGTATLS					2494
TcdA1-IB	SLQASVSLADSKTEKDTYASLCKIRRTKELDVTLPALGGPFDQVQRELSLQKAGLAKGCEALAVYTRDQDQGFQDFPHQGEYLFPEETALDQGTATLS					2494
TcdA1-TT01	FFNASKPESLQKQATMLKYSMDIIEKIKETIK	2520				2525
TcdA1-W14	FFNASKPESLQKQATMLKYSMDIIEKIKETIK					2514
TcdA1-IB	FFNASKPESLQKQATMLKYSMDIIEKIKETIK					2517

Figura 12 - Comparação entre as seqüências de aminoácidos da toxina TcdA1 dos isolados TT01, W14 e IB01 de *Photobacterium luminescens*.

```

      *           1620           *           1640           *           1660           *           1680
TcdA1-TT01 : WSRGQYHQR YR RLNTLFARQLV RA TGIDTILSHETQ ESS RWS-DNYTAD PE SS NGRS NI L LG S : 1670
tcdA1-W14 : WSRGQYHQR YR RLNTLFARQLV RA TGIDTILSHETQ ESS K F AYF RW NLETSQDEW DYIK S : 1658
TcdA1-IB  : WSRGQYHQR YR RLNTLFARQLV RA TGIDTILSHETQ ESS T A VEL RW NLETSQDEW DYIK S : 1668
TcdA4-W14 : WSRGQYHQR YR RLNTLFARQLV RA TGIDTILSHETQ ESS T A IEL RW NLETSQDEW DYIK S : 1538

      *           1700           *           1720           *           1740           *           1760
TcdA1-TT01 : K QFQDANVY D G T D K N - Q L N S E T Y I S I K E R S N N I K P V D G D S H I L L V D S T P I G E I F W F K N G T S D G T P : 1749
tcdA1-W14 : V D N - S H I S E N L T D T H - D E T ----- L D V P L N D O Y K A K M I S S P S D G T W G P K F V R D D K G I V I N P : 1737
TcdA1-IB  : F S G - K F P T P T S L A P T H - Q ----- R V D A N G D L I A V I S E N L V K K I N D E L A T D T K : 1739
TcdA4-W14 : F A G - K E E T S A L S I T O T T U R ----- R V N A Y G N L I A A Q V E N S V K E D N K P A T D T K : 1609

      *           1780           *           1800           *           1820           *           1840
TcdA1-TT01 : K N E S G R D P I F E N Q R E N D F S G A N S L F W K L F T T P H L V A Q A L L H E Q H F O E A N H L K V N S P S O T I V S O I D I T Y W S : 1829
tcdA1-W14 : K S I L T H K V M D H I E N D F S G A N S L F W K L F T T P H L V A Q A L L H E Q H F O E A N H L K V N S P S O T I V S O I D I T Y W S : 1817
TcdA1-IB  : N T F P G L A A N P T F E N D F S G A N S L F W K L F T T P H L V A Q A L L H E Q H F O E A N H L K V N S P S O T I V S O I D I T Y W S : 1818
TcdA4-W14 : N T F P G L A A N P T F E N D F S G A N S L F W K L F T T P H L V A Q A L L H E Q H F O E A N H L K V N S P S O T I V S O I D I T Y W S : 1809

```

Figura 13 - Segmento onde a proteína TcdA1-IB01 apresenta maior similaridade com a proteína TcdA4-W14.

TcdA4-7741 : MRSYVKEIIPVFLGQQGIVGIDYDICHYAPHEEFDQVYVHDLNPKRTHLYRPAAGGQKQKQLTERFLLEAFAPQIQNAVHSLGTLVYEAELGGTGWVFGGAA : 100
 TcdA4-W14 : MRSYVKEIIPVFLGQQGIVGIDYDICHYAPHEEFDQVYVHDLNPKRTHLYRPAAGGQKQKQLTERFLLEAFAPQIQNAVHSLGTLVYEAELGGTGWVFGGAA : 100
 TcdA4-18 : MRSYVKEIIPVFLGQQGIVGIDYDICHYAPHEEFDQVYVHDLNPKRTHLYRPAAGGQKQKQLTERFLLEAFAPQIQNAVHSLGTLVYEAELGGTGWVFGGAA : 100

TcdA4-7701 : SQYVAFGZVZSNYSPAATLTKLIREARHLSRSDSVYHLDEERFDLQGHYIICQHNHTELTLELAMEI LLEGERARQGLDITFEVHSLVYKPYGCTIP : 200
 TcdA4-W14 : SQYVAFGZVZSNYSPAATLTKLIREARHLSRSDSVYHLDEERFDLQGHYIICQHNHTELTLELAMEI LLEGERARQGLDITFEVHSLVYKPYGCTIP : 200
 TcdA4-18 : SQYVAFGZVZSNYSPAATLTKLIREARHLSRSDSVYHLDEERFDLQGHYIICQHNHTELTLELAMEI LLEGERARQGLDITFEVHSLVYKPYGCTIP : 200

TcdA4-7701 : YSDAYEKVKKAIQGGDFLQDQCFQVAVAGLHNSDGLGIRNRTAPELFRILYEEETKMAEIVYKYNPQDIDP*WIAKPEYLSKYNLSDSELDQFIRK : 300
 TcdA4-W14 : YSDAYEKVKKAIQGGDFLQDQCFQVAVAGLHNSDGLGIRNRTAPELFRILYEEETKMAEIVYKYNPQDIDP*WIAKPEYLSKYNLSDSELDQFIRK : 300
 TcdA4-18 : YSDAYEKVKKAIQGGDFLQDQCFQVAVAGLHNSDGLGIRNRTAPELFRILYEEETKMAEIVYKYNPQDIDP*WIAKPEYLSKYNLSDSELDQFIRK : 300

TcdA4-7701 : YPKWELTQKINHLKYNELLLGQAKLDFLREIITPQHTYPTVWQVYLVKTYWQYNIQYETALLQMSISQYVYVWQVDFINLWYKPYGCTIP : 400
 TcdA4-W14 : YPKWELTQKINHLKYNELLLGQAKLDFLREIITPQHTYPTVWQVYLVKTYWQYNIQYETALLQMSISQYVYVWQVDFINLWYKPYGCTIP : 400
 TcdA4-18 : YPKWELTQKINHLKYNELLLGQAKLDFLREIITPQHTYPTVWQVYLVKTYWQYNIQYETALLQMSISQYVYVWQVDFINLWYKPYGCTIP : 400

TcdA4-7701 : FYTSDNTDLHLSRDTYDMMKETVLERAPVYDIDILYRLLIATNHCNDGRIANNIKNLNLTMTLLADINQLYDELYALWITGCKKADLYTIGCKK : 500
 TcdA4-W14 : FYTSDNTDLHLSRDTYDMMKETVLERAPVYDIDILYRLLIATNHCNDGRIANNIKNLNLTMTLLADINQLYDELYALWITGCKKADLYTIGCKK : 500
 TcdA4-18 : FYTSDNTDLHLSRDTYDMMKETVLERAPVYDIDILYRLLIATNHCNDGRIANNIKNLNLTMTLLADINQLYDELYALWITGCKKADLYTIGCKK : 500

TcdA4-7701 : LKLLNHLDTLSNKEITGKNSVYGLFMTTMYDETLSPEIQGLWTFVYDGLMFDYKAKGLTTLETTAAYLQLPSEVARRSLWAKKINPSECKIT : 600
 TcdA4-W14 : LKLLNHLDTLSNKEITGKNSVYGLFMTTMYDETLSPEIQGLWTFVYDGLMFDYKAKGLTTLETTAAYLQLPSEVARRSLWAKKINPSECKIT : 600
 TcdA4-18 : LKLLNHLDTLSNKEITGKNSVYGLFMTTMYDETLSPEIQGLWTFVYDGLMFDYKAKGLTTLETTAAYLQLPSEVARRSLWAKKINPSECKIT : 600

TcdA4-7701 : TQKFWKQMGCI LELKFPFSDGQITQYCRCLAGLTKIYKRGIDHMAFALFISQETIFSEDEPKATFARMATYLLITRFANWVTCGESASFLIT : 700
 TcdA4-W14 : TQKFWKQMGCI LELKFPFSDGQITQYCRCLAGLTKIYKRGIDHMAFALFISQETIFSEDEPKATFARMATYLLITRFANWVTCGESASFLIT : 700
 TcdA4-18 : TQKFWKQMGCI LELKFPFSDGQITQYCRCLAGLTKIYKRGIDHMAFALFISQETIFSEDEPKATFARMATYLLITRFANWVTCGESASFLIT : 700

TcdA4-7701 : AFENKILTAAGLANNMHLNANGLIQNLSGACHYKQVYKAYTFANWQIAUFLQNTVYANQVNEPQDIEELKADYIQPQKITYTQKMMVLYAGL : 800
 TcdA4-W14 : AFENKILTAAGLANNMHLNANGLIQNLSGACHYKQVYKAYTFANWQIAUFLQNTVYANQVNEPQDIEELKADYIQPQKITYTQKMMVLYAGL : 800
 TcdA4-18 : AFENKILTAAGLANNMHLNANGLIQNLSGACHYKQVYKAYTFANWQIAUFLQNTVYANQVNEPQDIEELKADYIQPQKITYTQKMMVLYAGL : 800

TcdA4-7701 : DTQDHTLNAFLDKDFTALSHYYSLEIARRAAIKSPDGLYGLIDMQLAAIYTTAARRRAGLQVYVAFLEKIC*SAIADVITDQFIDWQVYK : 900
 TcdA4-W14 : DTQDHTLNAFLDKDFTALSHYYSLEIARRAAIKSPDGLYGLIDMQLAAIYTTAARRRAGLQVYVAFLEKIC*SAIADVITDQFIDWQVYK : 900
 TcdA4-18 : DTQDHTLNAFLDKDFTALSHYYSLEIARRAAIKSPDGLYGLIDMQLAAIYTTAARRRAGLQVYVAFLEKIC*SAIADVITDQFIDWQVYK : 900

TcdA4-7701 : EISTHAGVSLAETFEHYLDTPLIQYKEMSTLQYVDSGLHACTVEDAFKELTIFKQVARIKVTSAIRHDDMDQGLTYFICHKSTIAGYVRSV : 1000
 TcdA4-W14 : EISTHAGVSLAETFEHYLDTPLIQYKEMSTLQYVDSGLHACTVEDAFKELTIFKQVARIKVTSAIRHDDMDQGLTYFICHKSTIAGYVRSV : 1000
 TcdA4-18 : EISTHAGVSLAETFEHYLDTPLIQYKEMSTLQYVDSGLHACTVEDAFKELTIFKQVARIKVTSAIRHDDMDQGLTYFICHKSTIAGYVRSV : 1000

TcdA4-7701 : DEELNDLSTAAAKSKHYLDCAIHPYDTEIWPVIECSDFEYMARSRIRSDYRHHVYRYSRSTALKEKTHHMYTSL*EMHSLITASRDAKQ : 1100
 TcdA4-W14 : DEELNDLSTAAAKSKHYLDCAIHPYDTEIWPVIECSDFEYMARSRIRSDYRHHVYRYSRSTALKEKTHHMYTSL*EMHSLITASRDAKQ : 1100
 TcdA4-18 : DEELNDLSTAAAKSKHYLDCAIHPYDTEIWPVIECSDFEYMARSRIRSDYRHHVYRYSRSTALKEKTHHMYTSL*EMHSLITASRDAKQ : 1100

TcdA4-7701 : EPLGTCAGTQCGDTLVYHTRHSSLDIYETAPNGFTYEDHRSRILNDSQCRHTEDEDTMSTNVIKLNHYTAKNTEIPLRHHNSRHWSE : 1200
 TcdA4-W14 : EPLGTCAGTQCGDTLVYHTRHSSLDIYETAPNGFTYEDHRSRILNDSQCRHTEDEDTMSTNVIKLNHYTAKNTEIPLRHHNSRHWSE : 1200
 TcdA4-18 : EPLGTCAGTQCGDTLVYHTRHSSLDIYETAPNGFTYEDHRSRILNDSQCRHTEDEDTMSTNVIKLNHYTAKNTEIPLRHHNSRHWSE : 1200

and also? you are interested in the... (faint text)

TcdA4-TT01	YHLQGVYGGHTVIRKVVAAQDLKIKLIPKSAIIEGAKGQKRIQCQUMKRTGALQDRTIYTHIKWPFHSDKELLYFVTQYF	1220	1241	1261	1281	1300
TcdA4-W14	YHLQGVYGGHTVIRKVVAAQDLKIKLIPKSAIIEGAKGQKRIQCQUMKRTGALQDRTIYTHIKWPFHSDKELLYFVTQYF					1299
TcdA4-IB	YSLQGVYGGHTVIRKVVAAQDLKIKLIPKSAIIEGAKGQKRIQCQUMKRTGALQDRTIYTHIKWPFHSDKELLYFVTQYF					1307
TcdA4-TT01	KTTGTYAKPFTT	1320	1340	1360	1380	1400
TcdA4-W14	YLSGGVAAWIPGAGKSLIHENAKTGGCAKDEWKAQDLKQYIYHTDEG-TATDWSGTYDENTAISSKVVQITLACAGEKELTANKDVSQGGKPEEKE					1397
TcdA4-IB	KTTGTYAKPFTT					1395
TcdA4-TT01	KYQFNALKIDGSLAEYTHNSADIDVTYIALAGGKSLIETETIKYVGVETDINALYIFEDKQDQYRWCATWYKIMTIFARGLTEKATYGGDITLDM	1420	1440	1460	1480	1500
TcdA4-W14	KYQFNALKIDGSLAEYTHNSADIDVTYIALAGGKSLIETETIKYVGVETDINALYIFEDKQDQYRWCATWYKIMTIFARGLTEKATYGGDITLDM					1497
TcdA4-IB	KYQFNALKIDGSLAEYTHNSADIDVTYIALAGGKSLIETETIKYVGVETDINALYIFEDKQDQYRWCATWYKIMTIFARGLTEKATYGGDITLDM					1495
TcdA4-TT01	ETQNGDEPHMTCAYTEILIKRNPFCIRTKNSFKTIYQDEPKAGDHPFLYQGLDGIYQTEVAIFLRFYTHATGM	1520	1540	1560	1580	1600
TcdA4-W14	ETQNGDEPHMTCAYTEILIKRNPFCIRTKNSFKTIYQDEPKAGDHPFLYQGLDGIYQTEVAIFLRFYTHATGM					1597
TcdA4-IB	ETQNGDEPHMTCAYTEILIKRNPFCIRTKNSFKTIYQDEPKAGDHPFLYQGLDGIYQTEVAIFLRFYTHATGM					1594
TcdA4-TT01	YDAAEHREKRVKEDKPKATYDTTYSKQ-TYFGLASARYIQTSEPRDFDQAKSLYKELFTYTHLVAGLLLELQDGETRWKLPKVFPGQTYVGG	1620	1640	1660	1680	1700
TcdA4-W14	YDAAEHREKRVKEDKPKATYDTTYSKQ-TYFGLASARYIQTSEPRDFDQAKSLYKELFTYTHLVAGLLLELQDGETRWKLPKVFPGQTYVGG					1697
TcdA4-IB	YDAAEHREKRVKEDKPKATYDTTYSKQ-TYFGLASARYIQTSEPRDFDQAKSLYKELFTYTHLVAGLLLELQDGETRWKLPKVFPGQTYVGG					1694
TcdA4-TT01	IKNTWNYEYFLEHTDHWGDLLEIVDQDAVQHDPMHYEATYRHTLLELMAKQDQKQDLEEDTLEAKDWHYHGLALRLSCDFTYFLDQWNNPILDHA	1720	1740	1760	1780	1800
TcdA4-W14	IKNTWNYEYFLEHTDHWGDLLEIVDQDAVQHDPMHYEATYRHTLLELMAKQDQKQDLEEDTLEAKDWHYHGLALRLSCDFTYFLDQWNNPILDHA					1797
TcdA4-IB	IKNTWNYEYFLEHTDHWGDLLEIVDQDAVQHDPMHYEATYRHTLLELMAKQDQKQDLEEDTLEAKDWHYHGLALRLSCDFTYFLDQWNNPILDHA					1794
TcdA4-TT01	AAITIQALYIYATTLAQGTQTFALLLRSARYLTLQLPQIDHWMLSYWHEELALYNGRRLIQQGFLYLEHTATYADKALLSAAVATDQGGGDLQ	1820	1840	1860	1880	1900
TcdA4-W14	AAITIQALYIYATTLAQGTQTFALLLRSARYLTLQLPQIDHWMLSYWHEELALYNGRRLIQQGFLYLEHTATYADKALLSAAVATDQGGGDLQ					1897
TcdA4-IB	AAITIQALYIYATTLAQGTQTFALLLRSARYLTLQLPQIDHWMLSYWHEELALYNGRRLIQQGFLYLEHTATYADKALLSAAVATDQGGGDLQ					1894
TcdA4-TT01	FEKILNHEFHLEHAKSRVADITQGETLQNEIEKQKAEALWALQDQAKELIITLALIQDFTIEKIDAEKTVKSKKACACQHECHSRLYKEDWAGK	1920	1940	1960	1980	2000
TcdA4-W14	FEKILNHEFHLEHAKSRVADITQGETLQNEIEKQKAEALWALQDQAKELIITLALIQDFTIEKIDAEKTVKSKKACACQHECHSRLYKEDWAGK					1997
TcdA4-IB	FEKILNHEFHLEHAKSRVADITQGETLQNEIEKQKAEALWALQDQAKELIITLALIQDFTIEKIDAEKTVKSKKACACQHECHSRLYKEDWAGK					1994
TcdA4-TT01	HQKQKKEKALQDITDGLGDKMAAARALMVFNYGFAVGGTREGAKKMTATDQKTAAGLLIEAKRYGQSKLWRBRGQWETDQMKLADHQTDRQGL	2020	2040	2060	2080	2100
TcdA4-W14	HQKQKKEKALQDITDGLGDKMAAARALMVFNYGFAVGGTREGAKKMTATDQKTAAGLLIEAKRYGQSKLWRBRGQWETDQMKLADHQTDRQGL					2097
TcdA4-IB	HQKQKKEKALQDITDGLGDKMAAARALMVFNYGFAVGGTREGAKKMTATDQKTAAGLLIEAKRYGQSKLWRBRGQWETDQMKLADHQTDRQGL					2094
TcdA4-TT01	ELTVREKAAVGGTDLKATQGGQDQGLAFIQKRFQKALYMSRGRSAAIYFQYVGLVVAQCIMKQCATAMETHQASBTEYFGAGQTYADGLACDTEH	2120	2140	2160	2180	2200
TcdA4-W14	ELTVREKAAVGGTDLKATQGGQDQGLAFIQKRFQKALYMSRGRSAAIYFQYVGLVVAQCIMKQCATAMETHQASBTEYFGAGQTYADGLACDTEH					2197
TcdA4-IB	ELTVREKAAVGGTDLKATQGGQDQGLAFIQKRFQKALYMSRGRSAAIYFQYVGLVVAQCIMKQCATAMETHQASBTEYFGAGQTYADGLACDTEH					2194
TcdA4-TT01	HLAQKQDARLQDCHALVETVYLAQVYQSGGCESTALQKDEKALIQDREKTAHQDQKLETHHTLANTATLQDGLKLDYFQKQKQKTRIRIQE	2220	2240	2260	2280	2300
TcdA4-W14	HLAQKQDARLQDCHALVETVYLAQVYQSGGCESTALQKDEKALIQDREKTAHQDQKLETHHTLANTATLQDGLKLDYFQKQKQKTRIRIQE					2297
TcdA4-IB	HLAQKQDARLQDCHALVETVYLAQVYQSGGCESTALQKDEKALIQDREKTAHQDQKLETHHTLANTATLQDGLKLDYFQKQKQKTRIRIQE					2294
TcdA4-TT01	YSLPGLGPTDQVAVLYGQDQATGLARCKALAVSRQIMNSQFQDQEMDQKFLFFFDIDIRKQCTLIRFENATLQDFTLQHWIILNRYETLE	2320	2340	2360	2380	2400
TcdA4-W14	YSLPGLGPTDQVAVLYGQDQATGLARCKALAVSRQIMNSQFQDQEMDQKFLFFFDIDIRKQCTLIRFENATLQDFTLQHWIILNRYETLE					2397
TcdA4-IB	YSLPGLGPTDQVAVLYGQDQATGLARCKALAVSRQIMNSQFQDQEMDQKFLFFFDIDIRKQCTLIRFENATLQDFTLQHWIILNRYETLE					2394

Figura 14 - Comparação entre as seqüências de aminoácidos da toxina TcdA4 dos isolados TT01, W14 e IB01 de *Photobacterium luminescens*.

TcdA4-TT01	1620	1640	1660	1680	1543
TcdA4-W14					1546
TcdA4-IB					1544
TcdA2-W14					1653
TcdA4-TT01	1700	1720	1740	1760	1607
TcdA4-W14					1610
TcdA4-IB					1623
TcdA2-W14					1732
TcdA4-TT01	1780	1800	1820	1840	1684
TcdA4-W14					1687
TcdA4-IB					1700
TcdA2-W14					1812

Figura 15 - Segmento onde a proteína TcdA4-IB01 apresenta maior similaridade com a proteína TcdA2-W14.

4.4 - CLONAGEM DO GENE *tcdA1* JUNTO À SEQÜÊNCIA TIR NO VETOR pGEM-T Easy

Inicialmente, o fragmento TIR-gfp de aproximadamente 800 pb foi retirado do vetor pGreenTIR utilizando-se a enzima de restrição *SacI*, e o fragmento foi clonado em pGEM-T Easy originando o vetor TIRgfp/pGEM-TE. Colônias de *E. coli* transformadas com este vetor foram identificadas através da sua fluorescência.

Sítios de restrição para as enzimas *EcoRI* e *NdeI* foram introduzidos, por PCR, na extremidade 5' do gene *tcdA1* através da amplificação com os primers *tcdA1-EcoNde* e *tcdA-R2*. O produto de 2.570 pb foi clonado no vetor pGEM-T Easy produzindo o vetor *tcdA1-EcoNde/pGEM-TE*. A introdução do sítio de restrição para a enzima *EcoRI* foi um recurso utilizado para a adição de bases adjacentes acima ("upstream") do sítio de restrição para *NdeI* necessárias para o seu reconhecimento.

O fragmento *NdeI* do *tcdA1-EcoNde/pGEM-TE*, correspondente a 1.200 pb da extremidade 5' do gene *tcdA1*, foi clonado no TIRgfp/pGEM-TE também digerido com *NdeI* originando o vetor TIR-*tcdA1-Nde/pGEM-TE* que apresenta a seqüência TIR e o início do gene *tcdA1* até o sítio de restrição para a enzima *NdeI*. O restante do gene *tcdA1* (fragmento *BglII-SphI*) foi clonado no TIR-*tcdA1-*

Nde/pGEM-TE originando o TIR-tcdA1/pGEM-TE. As extremidades 5' e 3' do TIR-tcdA1 foram seqüenciadas, confirmando que a seqüência TIR foi introduzida com sucesso.

4.5 – AMPLIFICAÇÃO, CLONAGEM E SEQÜENCIAMENTO DE GENES *tccC* de *P. luminescens* IB01

Através da utilização dos *primers* desenhados para regiões conservadas de genes *tccC*, foi possível amplificar segmentos de aproximadamente 950 pb dos genes *tccC* de IB01. Foram analisadas as seqüências de 16 clones e foi realizada a comparação das seqüências obtidas com seqüências depositadas no GenBank. O clone 7 mostrou maior semelhança com o gene *tccC1-W14* (99,2 % idêntico), o clone 8 com o gene *tccC2-W14* (95,2 % idêntico), o clone 11 com o gene *tccC3-W14* (94,4 % idêntico) e o clone 12 com o gene *tccC6-TT01* (86,7 % idêntico) (Figura 16).

820 * 840 * 860 * 880 * 900

```

clone-07 :
tccC1-W14 :
clone-08 :
tccC2-W14 :
clone-11 :
tccC3-W14 :
clone-12 :
tccC6-TT01 :

```

* 920 * 940 * 960 * 980 *

```

clone-07 :
tccC1-W14 :
clone-08 :
tccC2-W14 :
clone-11 :
tccC3-W14 :
clone-12 :
tccC6-TT01 :

```

1000 * 1020 * 1040 * 1060 * 1080

```

clone-07 :
tccC1-W14 :
clone-08 :
tccC2-W14 :
clone-11 :
tccC3-W14 :
clone-12 :
tccC6-TT01 :

```

* 1100 * 1120 * 1140 * 1160 *

```

clone-07 :
tccC1-W14 :
clone-08 :
tccC2-W14 :
clone-11 :
tccC3-W14 :
clone-12 :
tccC6-TT01 :

```

1180 * 1200 * 1220 * 1240 * 1260

```

clone-07 :
tccC1-W14 :
clone-08 :
tccC2-W14 :
clone-11 :
tccC3-W14 :
clone-12 :
tccC6-TT01 :

```

* 1280 * 1300 * 1320 * 1340 *

```

clone-07 :
tccC1-W14 :
clone-08 :
tccC2-W14 :
clone-11 :
tccC3-W14 :
clone-12 :
tccC6-TT01 :

```

1360 * 1380 * 1400 * 1420 * 1440

```

clone-07 :
tccC1-W14 :
clone-08 :
tccC2-W14 :
clone-11 :
tccC3-W14 :
clone-12 :
tccC6-TT01 :

```

* 1460 * 1480 * 1500 * 1520 *

```

clone-07 :
tccC1-W14 :
clone-08 :
tccC2-W14 :
clone-11 :
tccC3-W14 :
clone-12 :
tccC6-TT01 :

```

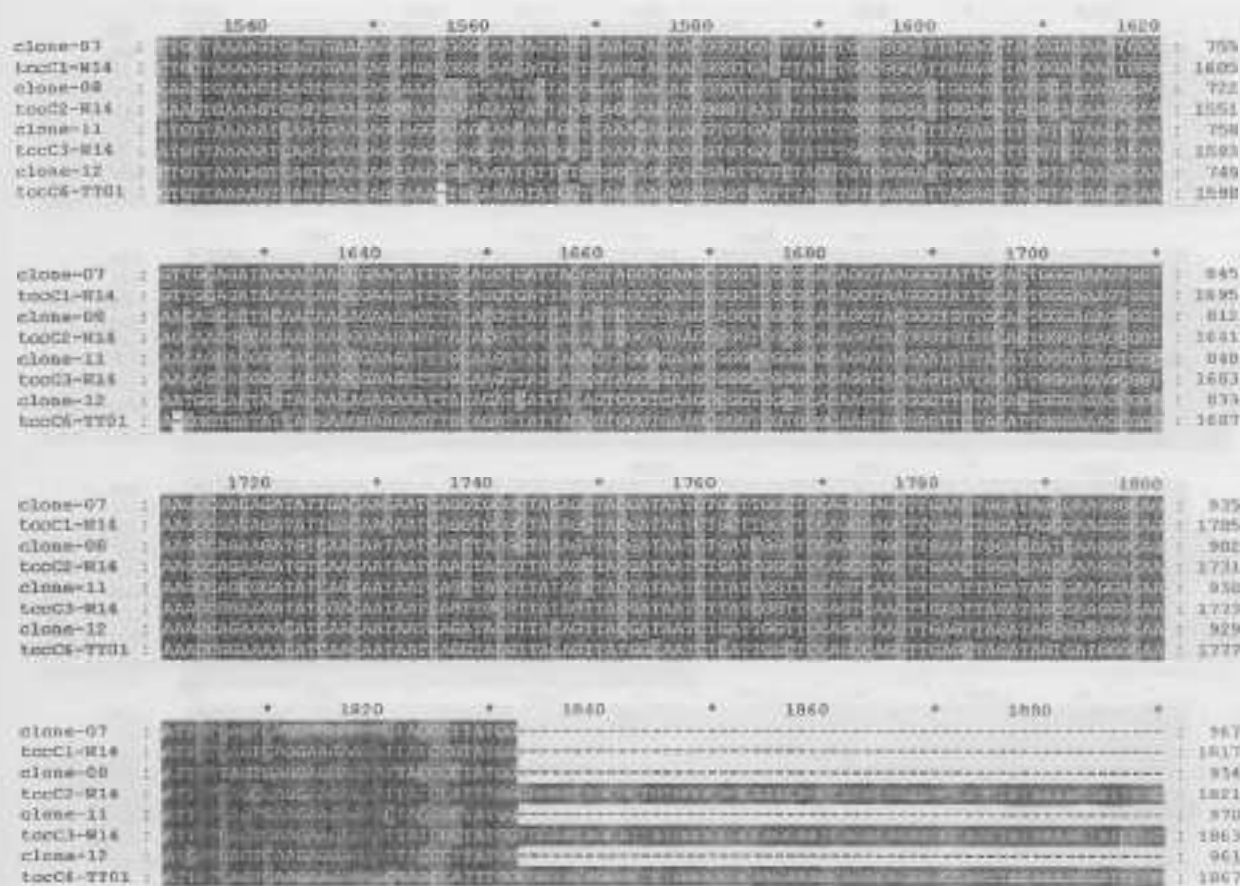


Figura 16 - Alinhamento das seqüências nucleotídicas de clones contendo genes *tccC* de *P. luminescens* IB01 e seqüências de genes *tccC* de *P. luminescens* linhagens W14 e TT01.

4.6 – AMPLIFICAÇÃO, CLONAGEM E SEQÜENCIAMENTO DE GENES *mcf* de *P. luminescens* IB01

Empregando-se os *primers* *mcf-F* e *mcf-R*, foi amplificado um produto de 917 pb a partir de DNA genômico de *P. luminescens* IB01. Após a clonagem em vetor pGEM-T Easy e seqüenciamento de 16 clones, estes formaram dois grupos sendo um similar ao gene *mcf1* e o outro ao gene *mcf2* dos isolados W14 e TT01 (Figura 17). O fragmento do gene *mcf1*-IB01 apresentou identidades de 98,6 % e 86,6 % aos genes *mcf1* dos isolados W14 e TT01, respectivamente. O fragmento do gene *mcf2*-IB01 apresentou identidades de 98,1 % e 86,8 % aos genes *mcf2* dos isolados W14 e TT01, respectivamente.

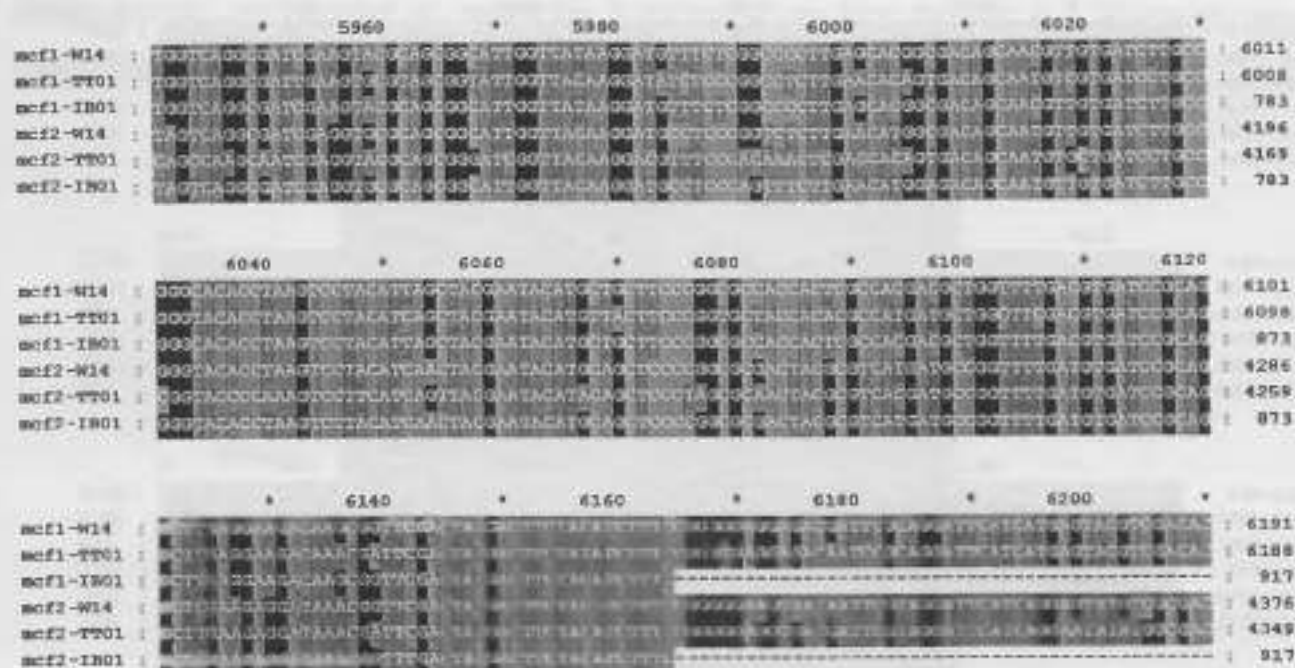


Figura 17 - Alinhamento das seqüências nucleotídicas de clones contendo genes *mcf* de *P. luminescens* IB01 e seqüências de genes *mcf* de *P. luminescens* linhagens W14 e TT01.

4.7 - AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM DE SEQÜÊNCIAS CONSERVADAS DE GENES *pks* DE *P. luminescens* IB01

O produto da amplificação por PCR, de aproximadamente 720 pb, foi clonado em vetor pGEM-TEasy e células de *E. coli* DH10B foram transformadas por eletroporação. Dezesesseis colônias foram submetidas a PCR empregando-se os primers T7 e SP6, para identificação daquelas que continham o inserto. Destas, 10 continham inserto do tamanho esperado e foram submetidas ao seqüenciamento.

Foi observada a existência de duas seqüências distintas dentre os 10 clones analisados. Uma delas, exemplificada pelo clone IB01-PKS-14, apresentou alta similaridade ao gene plu2312 de *P. luminescens* subsp. *laumondii* TT01, sendo as seqüências de aminoácidos 98,6 % idênticas (Figura 18) A outra seqüência, exemplificada pelo clone IB01-PKS-16, apresentou alta similaridade ao

gene plu1880 de *P. luminescens* subsp. *laumondii* TT01, com 97,7 % de identidade entre as seqüências de aminoácidos (Figura 18).

	2220	*	2240	*	2260	*	22											
TT01-plu2312	:	KAEQFDASLFGYSRQEAEMLDPOQR	RLFLQTAWHALEMASYAPRHVPLKTEVFGSSRVSTMPWSQFS	:	14													
IB01-PKS-14	:	-----	RLFLQTAWHALEMASYAPRHVPLKTEVFGSSRVSTMPWSQFS	:	4													
TT01-plu1880	:	GCAEFDARFFGYSSREAGQVMDPOQR	RLFLQTAWHALEMASYAPRHVPLKTEVFGSSRVSTMPWSQFS	:	227													
IB01-PKS-16	:	-----	RLFLQTAWHALEMASYAPRHVPLKTEVFGSSRVSTMPWSQFS	:	4													
	80	*	2300	*	2320	*	2340											
TT01-plu2312	:	MTDVGKIKGLCALISNDKDYLATR	AYKLNLSGSPVSIQTACSSSLVAVHACENLRA	EC	MD	LAG	:	20										
IB01-PKS-14	:	MTDVGKIKGLCALISNDKDYLATR	AYKLNLSGSPVSIQTACSSSLVAVHACENLRA	EC	MD	LAG	:	11										
TT01-plu1880	:	NQRMILDPGQWQIGNDKDFIATR	AYKLNLSGSPVSIQTACSSSLVAVHACENLRA	EC	MD	LAG	:	234										
IB01-PKS-16	:	NQRMILDPGQWQIGNDKDFIATR	AYKLNLSGSPVSIQTACSSSLVAVHACENLRA	EC	MD	LAG	:	11										
		*	2360	*	2380	*	2400	*										
TT01-plu2312	:	GVAVSFPQESCYLYQPGMIFSPDGLCRPFDAA	ANGTASGSGGMILKRLSALADGDTI	EA	VI	RG	S	:	27									
IB01-PKS-14	:	GVAVSFPQESCYLYQPGMIFSPDGLCRPFDAA	ANGTASGSGGMILKRLSALADGDTI	EA	VI	RG	S	:	17									
TT01-plu1880	:	AVALDPCQVGFVHVSGEIMSPDGLCRPFDAA	ANGTASGSGGMILKRLSALADGDTI	EA	VI	RG	S	:	241									
IB01-PKS-16	:	AVALDPCQVGFVHVSGEIMSPDGLCRPFDAA	ANGTASGSGGMILKRLSALADGDTI	EA	VI	RG	S	:	17									
	2420	*	2440	*	2460	*	248											
TT01-plu2312	:	AINNDGNEKVFETAPSVNGQRNVI	IBALQLADVSIIDVGMTEA	HGT	AT	SL	GDP	VE	IP	AL	TO	A	F	LE	Q	S	:	34
IB01-PKS-14	:	AINNDGNEKVFETAPSVNGQRNVI	IBALQLADVSIIDVGMTEA	HGT	AT	SL	GDP	VE	IP	AL	TO	A	F	LE	Q	S	:	22
TT01-plu1880	:	AINNDGAKVSYETAPSIDGQSVI	EDALRNAGVSPASISYEA	HGT	AT	SL	GDP	VE	IP	AL	TO	A	F	LE	Q	S	:	247
IB01-PKS-16	:	AINNDGAKVSYETAPSIDGQSVI	EDALRNAGVSPASISYEA	HGT	AT	SL	GDP	VE	IP	AL	TO	A	F	LE	Q	S	:	21

Figura 18 – Comparação entre as seqüências de aminoácidos de pks-IB01 e *P. luminescens* TT01.

4.8 – CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA DE COSMÍDEOS DE *P. luminescens* IB01

Através da utilização do pWEB-TNC Cosmid Cloning Kit foram obtidos 272 clones de *E. coli*, linhagem EPI100-T1 com insertos de aproximadamente 40.000 pb provenientes do DNA genômico de *P. luminescens* IB01. Destes clones, cinco apresentaram o gene *tcdA*, o que foi verificado através da amplificação por PCR de fragmentos com tamanhos entre 2.200 a 2.900 pb aproximadamente, quando utilizados os iniciadores *tcdA*-F1 e *tcdA*-R1.

Os clones contendo insertos que apresentaram o gene *tcdA* foram denominados IB01-01A07, IB01-02B04, IB01-02D08, IB01-01F02 e IB01-01D11. A digestão dos cosmídeos com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III permitiu a

obtenção de um padrão de restrição para cada um dos clones e a liberação do vetor pWEB de 5.821 pb conforme pode ser observado na Figura 19.

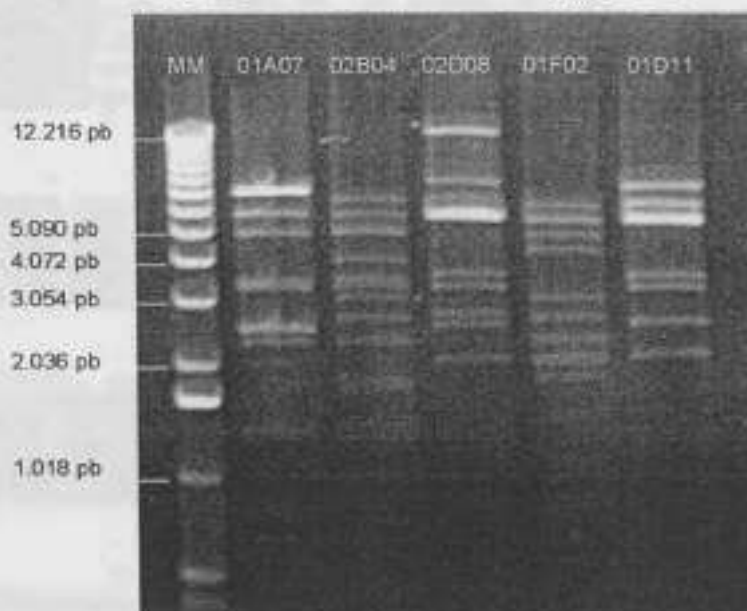


Figura 19 - Padrão de restrição com as enzimas *Bam*HI e *Hind*III dos cosmídeos IB01-01A07, IB01-02B04, IB01-02D08, IB01-01F02 e IB01-01D11. Eletroforese em gel de agarose 0,8 %. MM = marcador molecular 1 Kb DNA ladder (Invitrogen)

As seqüências das extremidades 5' e 3' dos clones IB01-01A07, IB01-02B04, IB01-02D08, IB01-01F02 e IB01-01D11 foram obtidas com a utilização dos iniciadores WEB-M13-F e T7.

A comparação destas seqüências com a ilha de patogenicidade de *P. luminescens* isolado W14 rica em genes *tc* ("toxin complex") (GenBank AF346500), indicou as regiões possivelmente englobadas pelos cosmídeos obtidos para o isolado IB01 (Figura 20). As seqüências obtidas para os clones IB01-01A07 e IB01-02D08 não permitiram localizá-los em regiões conhecidas dos genomas de *P. luminescens* W14 e TT01.

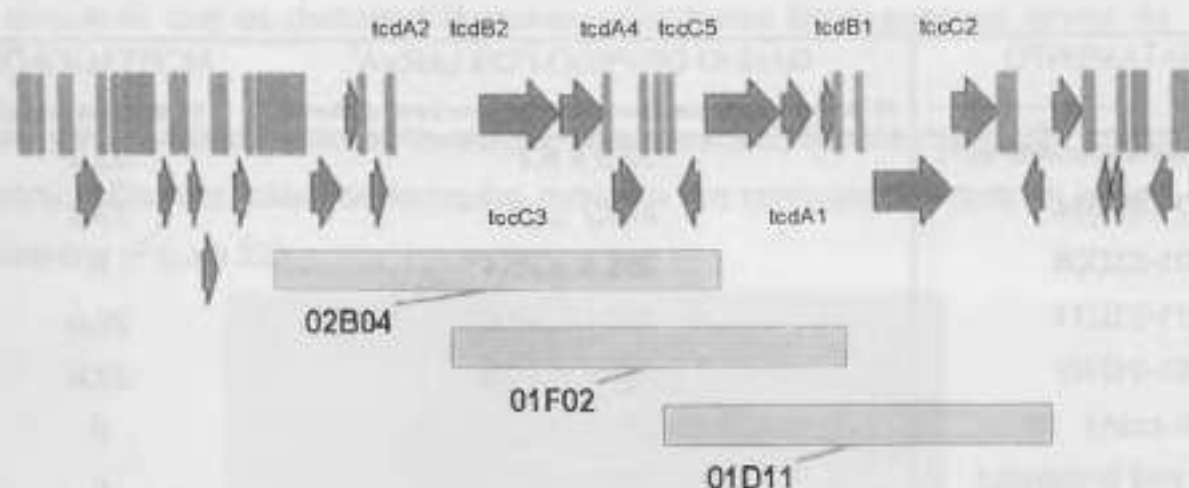


Figura 20 - Posição dos insertos dos cosmídeos IB01-02B04, IB01-01F02 e IB01-01D11 em relação à região contendo a ilha de patogenicidade de *P. luminescens* W14 (GenBank AF 346500).

4.9 – TOXICIDADE DE *P. luminescens* IB01 E DOS CLONES DE *E. coli* CONTENDO GENES *tc* CONTRA LARVAS DOS INSETOS *G. mellonella* E *D. saccharalis*

4.9.1 – Toxicidade oral e por injeção de *P. luminescens* IB01 e dos clones de *E. coli* contendo genes *tc* sobre larvas de *G. mellonella*

Larvas de *G. mellonella* que receberam dieta tratada com a cultura de *P. luminescens* IB01 apresentaram um aumento de peso médio significativamente inferior (26,43 %) ao aumento de peso médio apresentado pelas larvas que receberam os demais tratamentos e controle. A mortalidade das larvas que receberam este tratamento foi de 33,33%. Entre os clones contendo genes *tc*, os tratamentos IB01-01D11, IB01-01F02 resultaram em ganho de peso médio significativamente inferior ao ganho de peso médio daquelas que receberam dieta tratada com cultura de *E. coli* não transformada (controle). Estes mesmos clones provocaram a morte de 20% das larvas (Tabela 1).

Os demais tratamentos não diferiram significativamente do controle com relação ao ganho de peso como pode ser observado na Figura 21.

TRATAMENTO	GANHO DE PESO POR LARVA ¹	MORTALIDADE
	(% de aumento de peso em relação ao peso inicial por larva)	(% de larvas mortas)
<i>P. luminescens</i> IB01	32,2 ± 8,7 ^a	33,3
IB01-02B04	258,7 ± 25,3 ^{bc}	13,3
IB01-02D08	251,9 ± 25,1 ^{bc}	0
IB01-01D11	185,4 ± 32,0 ^b	20,0
IB01-01F02	164,5 ± 33,8 ^b	20,0
TIR-tcdA1	202,1 ± 21,9 ^b	0
<i>E. coli</i> (controle)	329,5 ± 26,3 ^c	0
CV (%)	22,05	

Tabela 1 - Ganho de peso em relação ao peso inicial, por grupo de 5 larvas, de *G. mellonella* alimentadas com dieta artificial tratada com culturas de *P. luminescens* IB01 e dos clones de *E. coli* IB01-02B04, IB01-02D08, IB01-01D11, IB01-01F02 e TIR-tcdA1. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

¹ Média ± Erro Padrão da Média

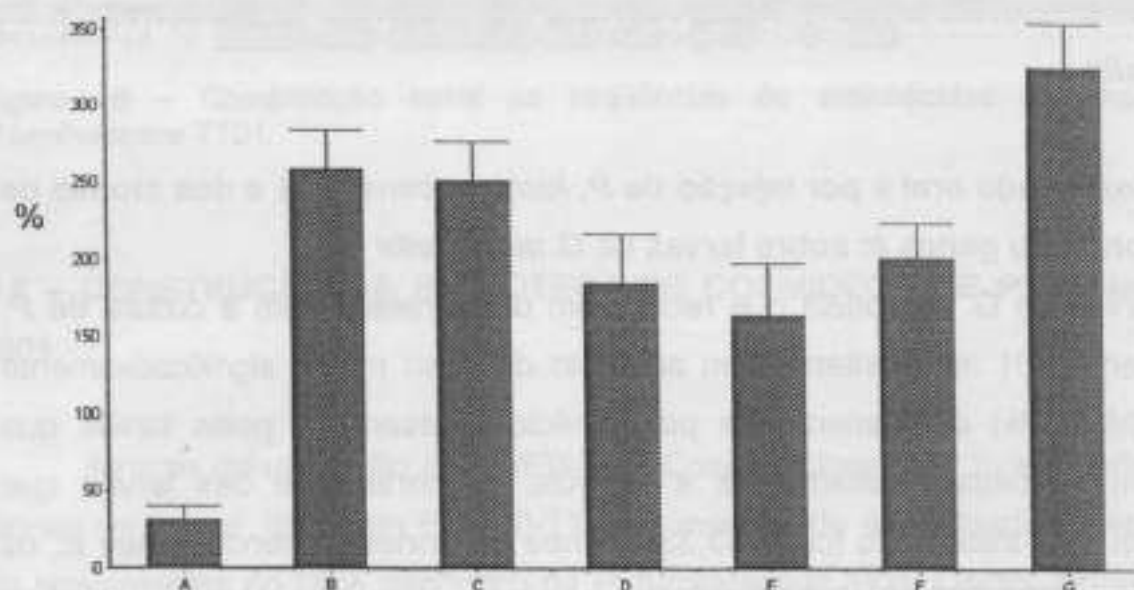


Figura 21 - Ganho de peso em relação ao peso inicial, por larva, de *G. mellonella* alimentadas com dieta artificial tratada com A - cultura de *P. luminescens* IB01, B - clone IB01-02B04, C - clone IB01-02D08, D - clone IB01-01D11, E - clone IB01-01F02, F - clone TIR-tcdA1 e G - *E. coli* não transformada (controle).

A injeção de 5 µL do sobrenadante de cultura do isolado IB01 de *P. luminescens* provocou a morte de 93,3 % das larvas de *G. mellonella* após 48

horas, enquanto que os demais tratamentos não foram letais para as larvas do inseto.

As larvas mortas apresentavam aspecto característico de coloração muito escurecida e flacidez, além de tamanho reduzido em comparação com as larvas sobreviventes (Figura 22).

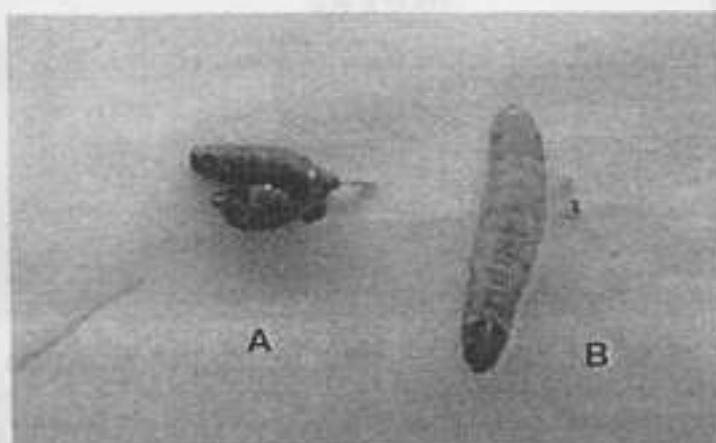


Figura 22 - Aspecto de larvas de *G. mellonella* A - 24 horas após receber injeção de 5 μ L do sobrenadante de cultura de *P. luminescens* IB01, B - 24 horas após receber injeção de 5 μ L do sobrenadante de cultura de *E. coli* não transformada (controle).

4.9.2 – Toxicidade oral e por injeção de *P. luminescens* IB01 e dos clones de *E. coli* contendo genes *tc* sobre larvas de *D. saccharalis*

Larvas de *D. saccharalis* que receberam dieta tratada com a cultura de *P. luminescens* IB01 apresentaram um ganho de peso de 12,39 % enquanto que as larvas do tratamento controle tiveram um aumento de peso médio por larva de 22,62 % (Figura 23). Nenhum dos tratamentos provocou a morte das larvas (Tabela 2).

Devido à grande variação observada neste experimento, as diferenças obtidas nas porcentagens de ganho de peso não foram significativas pelas análises estatísticas.

TRATAMENTO	GANHO DE PESO POR LARVA ¹	MORTALIDADE
	(% de aumento de peso em relação ao peso inicial por larva)	(% de larvas mortas)
<i>P. luminescens</i> IB01	12,3 ± 8,1	0
IB01-02B04	27,9 ± 10,1	0
IB01-02D08	23,0 ± 5,2	0
IB01-01D11	16,0 ± 9,2	0
IB01-01F02	28,9 ± 7,5	0
TIR-tcdA1	18,8 ± 6,0	0
<i>E. coli</i> (controle)	22,6 ± 3,2	0
CV (%)	60,2	

Tabela 2 - Ganho de peso em relação ao peso inicial, por grupo de 5 larvas, de *D. saccharalis* alimentadas com dieta artificial tratada com culturas de *P. luminescens* IB01 e dos clones de *E. coli* IB01-02B04, IB01-02D08, IB01-01D11, IB01-01F02 e TIR-tcdA1. Médias não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

¹ Média ± Erro Padrão da Média

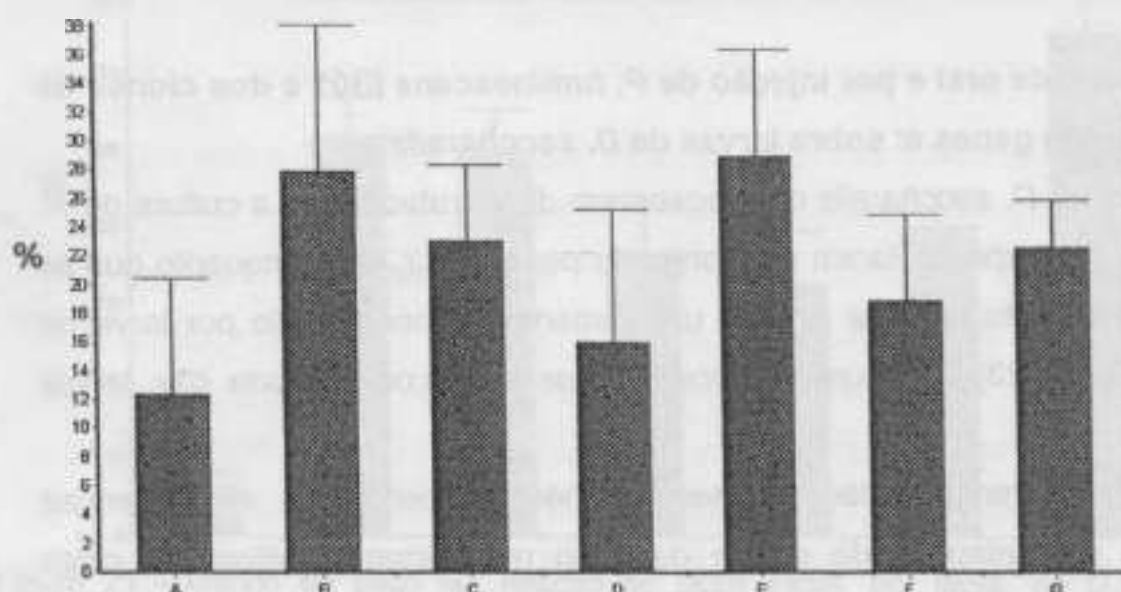


Figura 23 - Ganho de peso em relação ao peso inicial, por larva, de *D. saccharalis* alimentadas com dieta artificial tratada com A - cultura de *P. luminescens* IB01, B - clone IB01-02B04, C - clone IB01-02D08, D - clone IB01-01D11, E - clone IB01-01F02, F - clone TIR-tcdA1 e G - *E. coli* não transformada (controle).

Das larvas de *D. saccharalis*, 86,6 % morreram 48 horas depois de receberem injeção de 3 μ L do sobrenadante de cultura do isolado IB01 de *P.*

luminescens, enquanto que os demais tratamentos não foram letais para as larvas do inseto.

As larvas mortas apresentavam aspecto característico de coloração mais escura e flacidez em comparação com as larvas sobreviventes (Figura 24).

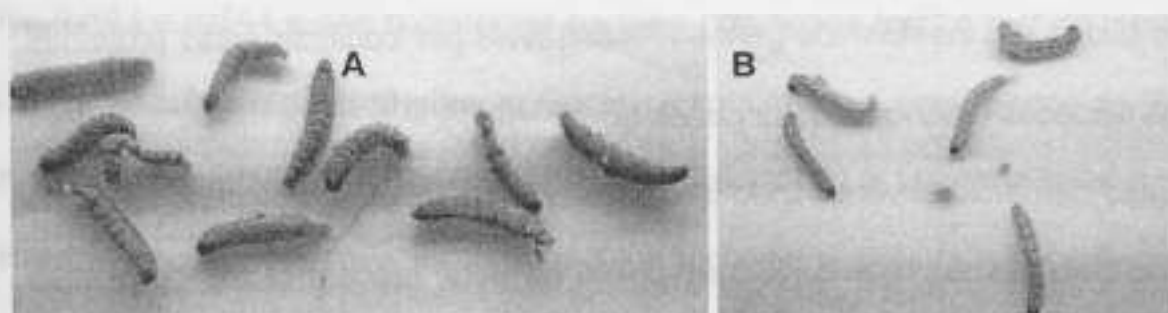


Figura 24 - Aspecto de larvas de *D. saccharalis* A - 48 horas após receber injeção de 3 μ L do sobrenadante de cultura de *P. luminescens* IB01, B - 24 horas após receber injeção de 3 μ L do sobrenadante de cultura de *E. coli* não transformada (controle).

5. DISCUSSÃO

A bactéria *P. luminescens*, que vive em simbiose com nematóides do gênero *Heterorhabditis* sintetiza e secreta, entre outras substâncias proteínas com atividade tóxica pra insetos. Os genes responsáveis por codificar estas proteínas foram identificados e denominados genes *tc*.

Estes nematóides vêm sendo utilizados como agentes de controle biológico de insetos cujas larvas, que se desenvolvem no solo, atacam raízes de plantas economicamente importantes. Porém, os genes *tc* potencialmente oferecem possibilidades de utilização no controle de insetos que atacam partes aéreas de plantas, através da sua utilização na produção de transgênicos. A produção de plantas transgênicas, porém, nem sempre é viável e para que seja feita é necessário um grande volume de conhecimento a respeito do gene que se quer introduzir na planta. Além de dificuldades de ordem técnica a sua utilização também enfrenta problemas de ordem legal uma vez que o plantio comercial de uma variedade transgênica nem sempre é permitido.

Uma alternativa interessante para a utilização destas toxinas produzidas por *P. luminescens* no controle biológico de insetos praga de partes aéreas de plantas é a introdução dos genes *tc* em bactérias endofíticas que podem ser utilizadas como inóculo e que tem capacidade de colonizar os tecidos internos da planta.

P. luminescens IB01 foi isolado a partir do nematóide *Heterorhabditis indica* e identificado como *P. luminescens* subsp. *akhurstii*. De fato, foi observado que bactérias do gênero *Photorhabdus* se associam exclusivamente com nematóides do gênero *Heterorhabditis*, assim como o gênero *Xenorhabdus* está intimamente

relacionado com nematóides do gênero *Steinernema*, sendo esta associação um dos parâmetros utilizados para a identificação destas bactérias (Boemare et al 1993, Forst e Nielsen, 1996, Rajagopal e Bhatnagar, 2002). Além da seqüência do gene que codifica o rRNA16S, a comparação das seqüências completas dos genes *tcdA1* e *tcdA4* e das seqüências parciais dos genes *tccC* e *mcf* do isolado IB01 com seqüências depositadas no GenBank confirmam a semelhança de IB01 com a linhagem W14 isolada por Bowen e Ensign (1998) e identificada como *P. luminescens* subsp. *akhurstii*. Fischer-Le Saux e colaboradores (1998) verificaram que a ocorrência de *Heterorhabditis indica* é restrita a regiões tropicais e que sempre estão associados ao subgrupo genotípico Ila de *P. luminescens*.

Uma análise mais apurada das seqüências de aminoácidos das proteínas codificadas pelos genes *tcdA* do isolado IB01 mostra que existe identidade parcial na região entre os aminoácidos 1636 e 1754 codificados por *tcdA1* de IB01 com seqüência de aminoácidos codificados pelo gene *tcdA4* da linhagem W14 (região entre os aminoácidos 1506 e 1624). Da mesma forma ocorre identidade parcial entre os aminoácidos codificados por *tcdA4* de IB01, região entre 1507 e 1635, e *tcdA2* de W14 (região entre os aminoácidos 1616 e 1744).

Os genes *tc*, que codificam toxinas em *P. luminescens*, aparecem em estruturas denominadas ilhas de patogenicidade nas quais os genes se encontram dispostos em seqüência. No isolado W14, quatro genes *tcdA* (*tcdA1*, *tcdA2*, *tcdA3* e *tcdA4*) foram encontrados junto a genes *tcdB* e *tccC* em uma região do genoma denominada "*tc-toxin island*" (Waterfield et al, 2004). No isolado IB01 além dos genes *tcdA1* e *tcdA4*, também foram encontrados genes semelhantes a *tcdA2* e *tcdA3*. A semelhança entre os genes *tcdA* e sua proximidade nas ilhas de

patogenicidade pode favorecer a recombinação entre eles, o que deve ser a causa da identidade entre regiões de *tcdA1*-IB01 e *tcdA4*-W14, e de *tcdA4*-IB e *tcdA2*-W14 encontradas para os isolado IB01 e W14.

As seqüências parciais dos genes *tccC* encontrados em IB01 mostraram que estão presentes no genoma deste isolado pelo menos quatro loci diferentes que apresentam semelhança com os genes *tccC1*, *tccC2* e *tccC3* de W14 e *tccC6* da linhagem TT01.

Além de genes codificadores de toxinas, o isolado IB01 também apresenta genes codificadores de policetídeos com seqüências de aminoácidos semelhantes àquelas encontradas em *P. luminescens* TT01 (Duchaud et al., 2003). Estes genes ainda não foram investigados na linhagem W14.

A semelhança das seqüências de genes que codificam toxinas de IB01 com W14 indica que a linhagem nativa é potencialmente tóxica a insetos de várias ordens uma vez que a linhagem W14 vem sendo testada por diversos autores com relação à toxicidade oral e injetável de culturas de células, sobrenadantes de culturas, toxinas purificadas e clones de *E. coli* transformadas com seus genes (Bowen et al. 1998, Bowen e Ensign, 1998, Guo et al. 1999, Waterfield et al., 2001, Daborn et al. 2002, Waterfield et al. 2003, Waterfield et al. 2005 e Blackburn et al. 2005).

A utilização de *primers* específicos para genes *tcdA* permitiu a seleção de cinco clones da biblioteca de cosmídeos do isolado IB01 de *P. luminescens* que contém genes *tc*. O seqüenciamento das extremidades dos insertos dos cosmídeos dos clones IB01-02B04, IB01-01D11 e IB01-01F02 permitiu a localização destes segmentos no locus AF346500 de 127.816 pb do genoma de

da linhagem W14 de *P. luminescens*, que corresponde a uma ilha de patogenicidade. A seqüência inicial do inserto presente no clone IB01-02B04 apresenta similaridade com a região que se inicia no nucleotídeo 24.206 do locus AF346500 e a seqüência final do mesmo clone apresenta similaridade com a região que termina no nucleotídeo 66.594 e que engloba os genes *tcdA2*, *tcdB2*, *tccC3* e parte de *tcdA4*. No locus AF346500, este segmento apresenta 42.375 pb que corresponde ao tamanho aproximado dos fragmentos de DNA do isolado IB01 que foram clonados no vetor p WEB-TNC. A semelhança entre as seqüências de nucleotídeos de IB01 e W14, e a correspondência do tamanho aproximado dos fragmentos clonados indicam a presença destes genes no inserto de IB01-02B04.

Da mesma forma, o segmento inicial do inserto presente no clone IB01-01D11 apresenta similaridade com a região que se inicia no nucleotídeo 61.144 e a seqüência final, com a região que termina no nucleotídeo 98.175 correspondendo a uma seqüência de 37.031 pb do locus AF346500 que engloba os genes *tcdA4*, *tccC5*, *tcdA1* e *tcdB1*. O inserto presente no clone IB01-01F02 apresenta similaridade com a região que se inicia no nucleotídeo 40.987 e a seqüência final, com a região que termina no nucleotídeo 78.547 correspondendo a uma seqüência de 37.560 pb do locus AF346500 que engloba os genes *tcdA2*, *tcdB2*, *tccC3*, *tcdA4* e *tccC5*.

A presença de múltiplas cópias de genes codificadores de toxinas favorece o surgimento de novas variantes, não somente pela possibilidade de recombinação entre elas, mas também porque enquanto um dos genes exerce a função a que se destina os demais estariam livres para sofrerem mutações. Os resultados obtidos até o momento indicam que há uma enorme diversidade de

genes codificadores de toxinas contra insetos a ser descoberta dentre as bactérias simbiontes de nematóides entomopatogênicos do Brasil. Os primers degenerados para os genes *tcdA* e *tccC*, desenvolvidos no presente trabalho, permitem uma rápida avaliação da diversidade de genes codificadores de entomotoxinas de *P. luminescens*.

A escolha do gene *tcdA1* para clonagem e expressão deveu-se à toxicidade oral da proteína codificada pelos genes *tcdA* de *P. luminescens* observada para larvas de *Manduca sexta* e *Diabrotica undecimpunctata*. Porém, apenas a proteína codificada pelo gene *tcdA* não é capaz de conferir completa toxicidade oral a larvas de insetos. Waterfield e colaboradores (2001) introduziram os genes *tcdA*, *tcdB* e *tccC* da linhagem W14 de *Photorhabdus luminescens* em células de *E. coli* através de diferentes plasmídeos recombinantes e concluíram que uma alta toxicidade oral contra larvas do inseto *M. sexta* depende da presença dos três genes. Um gene sintético com seqüência otimizada para expressão em plantas e baseado em *tcdA1* de *P. luminescens* W14 foi introduzido em *Arabidopsis thaliana* por Liu e colaboradores (2003). Foi obtida uma planta transgênica capaz de expressar a toxina A (TcdA) e que demonstrou ser tóxica para larvas de *M. sexta* que se alimentaram dela. Os autores demonstraram que a toxina A extraída de plantas transgênicas de *A. thaliana* teve um forte efeito inibitório ao crescimento de *Diabrotica undecimpunctata*. Embora a expressão do gene *tcdA* em um organismo transgênico (*E. coli* ou *A. thaliana*) confira toxicidade oral, ela só é totalmente atingida quando três genes do complexo tc; *tcdA*, *tcdB* e *tccC*, são expressos simultaneamente. Os genes *tcdB* e *tccC* são provavelmente

potenciadores da toxina *tcdA* e quando expressos juntos, no mesmo citoplasma, conferem ao organismo toxicidade oral completa (Waterfield et al 2005).

Os testes de toxicidade realizados neste trabalho, embora preliminares, mostraram que substâncias produzidas e secretadas em meio de cultura pelo isolado IB01 de *P. luminescens* provocam a morte de larvas dos insetos *G. mellonella* (93,3 %) e *D. saccharalis* (86,6 %) após 48 horas quando injetadas na hemocela destes insetos. Bowen e Ensign (1998) observaram mortalidade de larvas de *M. sexta* em 48 horas quando injetaram meio de cultura filtrado dos isolados Hm e W14 de *P. luminescens*. Toxinas purificadas a partir da cultura de W14 injetadas em larvas de *M. sexta* também promoveram 100 % de mortalidade nas concentrações de 5 e 0,5 µg.

Embora o lepidoptero *M. sexta* seja considerado um modelo experimental para a identificação de novos fatores de virulência de *P. luminescens* (Silva et al. 2002) e tenha sido usado na maioria dos experimentos de toxicidade da bactéria (Blackburn et al. 1998, Bowen et al. 1998, Bowen e Ensign, 1998, Daborn et al. 2001, Waterfield et al. 2001, Daborn et al. 2002, Liu et al. 2003, Waterfield et al. 2005), a suscetibilidade das larvas do inseto *G. mellonella* à infecção por nematóides do gênero *Heterorhabditis* é bastante conhecida, e estas larvas são utilizadas para a multiplicação dos nematóides com finalidade de experimentação científica (Gerristein et al., 1998; Boff et al., 2000; Rajagopal e Bhatnagar, 2002). Na natureza, *P. luminescens* é liberada pelo nematóide simbiote no interior das larvas do hospedeiro, onde se torna patogênica causando a morte do inseto. Daborn et al. (2001) comprovaram a expressão dos genes *tcaB* e *tcdB* durante a infecção de larvas de *M. sexta* por *P. luminescens* W14. Os resultados obtidos no

presente estudo confirmaram que *P. luminescens* IB01 também secreta toxinas no meio de cultura que promove a morte de *G. mellonella* quando injetadas na hemocela de larvas do inseto.

Testes de toxicidade de *P. luminescens* contra *D. saccharalis* foram realizados pela primeira vez no presente trabalho demonstrando a toxicidade de IB01 também contra esta espécie.

P. luminescens produz pelo menos três grupos de entomotoxinas: complexo Tc, Mcf e Txp40. Um clone de *E. coli*, selecionado a partir de uma biblioteca de cosmídeos de W14, contendo o gene *mcf* que codifica uma proteína denominada Mcf ("makes caterpillar floppy") promoveu a rápida perda de turgor e morte de larvas de *M. sexta* quando injetado na hemocela (Waterfield et al. 2004). No isolado IB01 foram encontradas seqüências semelhantes às dos genes *mcf1* e *mcf2* de W14 indicando a presença destes genes no seu genoma. Embora a presença da proteína Mcf não tenha sido verificada em sobrenadantes de culturas de *P. luminescens*, é possível que a morte das larvas de *G. mellonella* e *D. saccharalis* observadas neste trabalho tenha sido causada por esta toxina ou, mais provavelmente, pelo efeito conjunto das toxinas Tc e Mcf. Vale ressaltar que foi observada grande perda de turgor nas larvas de *G. mellonella* que receberam injeção de sobrenadante de cultura de IB01 e esta mesma característica também pôde ser observada nas larvas do inseto que morreram após se alimentarem de dieta tratada com cultura de *P. luminescens* IB01. Perda de turgor também ocorreu nas larvas de *D. saccharalis* que morreram em decorrência da injeção de sobrenadante de cultura de IB01, porém não foi tão evidente.

A toxina Txp40 purificada a partir da linhagem V16 de *P. luminescens* também provocou a morte de larvas de *G. mellonella* e *Helicoverpa armigera* Hübner através de injeção na hemocela (Brown et al. 2006). A presença da toxina Txp40 em meio de cultura também não foi ainda verificada e nem a presença do gene *txp40* no isolado IB01, porém a contribuição desta toxina na morte das larvas testadas neste trabalho não pode ser descartada.

A adição de cultura de IB01 na dieta de *G. mellonella* foi letal para 33,3 % das larvas, porém não foi suficiente para provocar a morte das larvas de *D. saccharalis*, IB01 causou redução significativa no ganho de peso de larvas de *G. mellonella*. Este resultado pode ter ocorrido devido à baixa concentração de toxinas produzidas pelas células da bactéria nas condições dos experimentos e pela menor sensibilidade de *D. saccharalis* às toxinas de *P. luminescens*. Ensaios de toxicidade oral bem sucedidos contra larvas de insetos têm sido realizados com toxinas purificadas do isolado W14. O complexo A, codificado pelos genes *tca*, *tcb* e *tcc* de W14, quando avaliado contra larvas neonatas de *Manduca sexta*, resultou em uma DL_{50} de 875 ng/cm³ de dieta após 7 dias (Bowen et al., 1998). Bowen e Ensign (1998) observaram que toxinas purificadas da linhagem W14 provocam mortalidade oral maior que 30 % em larvas de *M. sexta*, *G. mellonella*, *Tenebrio molitor* L., *Monomorium pharaonis* L. e *Blattella germanica* L. Toxinas purificadas a partir do meio de cultura do isolado W14 se mostraram altamente tóxicas ao caruncho do milho, *Diabrotica undecimpunctata howardi*, quando adicionadas à dieta artificial das larvas. Dois complexos protéicos foram testados, A e B, com DL_{50} de 5 e 87 ng/cm³ de dieta respectivamente (Guo et al., 1999). Blackburn e colaboradores (2005) testaram a atividade tóxica da proteína Tca, contra larvas do

escaravelho da batateira (*Leptinotarsa decemlineata* Say) e da mosca branca (*Bemisia tabaci* Gen.) encontrando DL_{50} de 2.7 ppm para *L. decemlineata* e uma dose entre 0,1 e 0,3 ppm para a inibição da progressão das ninfas de *B. tabaci* para o primeiro instar.

Cultura da linhagem K122 (oralmente atóxica) de *P. luminescens*, transformada com os genes *tcdA* e *tcdB*, passou a ser letal contra *M. sexta* quando adicionada à dieta das larvas. Sobrenadantes das culturas de W14, K122 [pA1] transformada com o *loci tca* (*tcaA*, *tcaB* e *tcaC*) e K122 [pD1] transformada com o *loci tcd* (*tcdA* e *tcdB*) também foram oralmente tóxicos, com doses efetivas em relação à concentração do sobrenadante de respectivamente: $DE_{50} = 0,05x$, $0,23x$ e $0,003x$ (Waterfield et al. 2001b).

Os clones IB01-01D11 e IB01-01F02 provocaram 20% de mortalidade quando suas culturas foram adicionadas à dieta artificial das larvas de *G. mellonella* e o ganho de peso das larvas sobreviventes foram, respectivamente, 27,5 e 33,4 % menores do que o ganho de peso das larvas controle (cultura de *E. coli* adicionada à dieta). Ambos os clones possivelmente contêm genes *tcdA*, *tcdB* e *tccC*. Clones de *E. coli* contendo os genes *tcdA*, *tcdB* e *tccC* de *P. luminescens* W14 promoveram grande inibição no ganho de peso de larvas de *M. sexta* quando suas culturas foram adicionadas à dieta das larvas, porém o clone testado que não continha o gene *tccC* não inibiu significativamente o ganho de peso das larvas (Waterfield et al. 2001). Aparentemente, a presença dos três *loci* é necessária para a toxicidade oral de *P. luminescens* e é possível que o número de cópias do gene *tcdA* seja um fator importante para a toxicidade já que os clones mais efetivos oralmente, IB01-01D11 e IB01-01F02, provavelmente contêm os genes

tcdA2/tcdA4 e *tcdA4/tcdA1* respectivamente, enquanto o clone IB01-02B04 teria apenas o gene *tcdA2* completo, o mesmo acontecendo com o clone IB01-02D08 cujas extremidades não foram seqüenciadas. Outra possibilidade a ser investigada é a eficiência de cada um dos genes *tcdA* de *P. luminescens* uma vez que IB01-01D11 e IB01-01F02 apresentariam em comum o gene *tcdA4*, que não ocorreria nos clones IB01-02B04 e IB01-02D08.

Waterfield e colaboradores (2001 e 2005) constataram que a presença apenas do gene *tcdA* não é suficiente para proporcionar toxicidade oral completa a clones de *E. coli*, porém algum nível de toxicidade oral contra *M. sexta* foi observada para clones contendo apenas o gene *tcdA1*, assim como plantas de *A. thaliana* transformadas com o gene *tcdA1* de *P. luminescens* W14 também mostraram toxicidade oral parcial contra larvas de *M. sexta* e *D. undecimpunctata howard* (Liu et al. 2003). No presente trabalho, o clone TIR-*tcdA1* que carrega o gene *tcdA1* de IB01 precedido da seqüência TIR foi capaz de promover redução significativa no ganho de peso de larvas de *G. mellonella* quando comparado com o controle, porém não causou morte das larvas. A eficiência oral parcial deste clone pode estar associada a um aumento da expressão do gene *tcdA1* promovido pela presença da seqüência TIR, indicando que a toxicidade oral pode também estar relacionada com o nível de expressão do gene *tcdA1*.

O efeito oral de IB01 e dos clones de *E. coli* sobre larvas de *D. saccharalis* não foi significativamente diferentes do controle embora tenha sido possível observar que o ganho de peso das larvas tratadas com IB01 foi menor do que o daquelas que receberam os demais tratamentos e o controle. Durante o acompanhamento do experimento foi possível observar uma grande variação com

no peso das larvas entre as repetições de cada tratamento. É possível que na população das larvas utilizadas neste experimento ocorra variação quanto à suscetibilidade às toxinas Tc. Variação na quantidade de alimento ingerida por cada larva resulta em maior ou menor exposição às toxinas, o que também pode ter contribuído para o resultados obtidos.

P. luminescens e as toxinas Tc ainda não haviam sido testadas contra larvas do inseto *D. saccharalis* e, portanto, questões como concentração dos tratamentos e fase do desenvolvimento do inseto em que o tratamento deve ser ministrado ainda precisam ser elucidadas.

Na natureza, as toxinas Tc são levadas ao interior da larva do inseto hospedeiro pelo nematóide simbiote, porém, para serem utilizadas na forma de controle biológico e/ou na produção de uma planta transgênica, é desejável que as toxinas sejam efetivas através de ingestão. As toxinas Tc de IB01 mostraram toxicidade oral incompleta a larvas de *G. mellonella* e *D. saccharalis* em testes preliminares assim como clones contendo genes *tc* também foram parcialmente tóxicos a larvas de *G. mellonella*, indicando a potencial utilização destes genes.

Os cosmídeos contendo genes *tc*, obtidos no presente trabalho, deverão ser totalmente seqüenciados para que a ilha de patogenicidade de IB01 possa ser caracterizada e comparada com as das estirpes W14 e TT01. A biblioteca de cosmídeos também poderá ser facilmente prospectada, por PCR, para outros genes codificadores de toxinas como *mcf*, *txp40* e *tcaABC*. A disponibilidade das seqüências destes genes facilitará a manipulação dos mesmos visando a sua aplicação biotecnológica no controle de pragas da agricultura. Outros genes de interesse que poderão ser buscados nesta biblioteca são aqueles codificadores de

sintetases de policetídeos, envolvidos na síntese de antibióticos, que por serem extensos, dificilmente são obtidos por outros métodos de clonagem.

5. CONCLUSÕES

1 - A bactéria isolada de nematóide nativo do gênero *Heterorhabditis* foi identificada como *Photorhabdus luminescens* subsp. *akhurstii* através de comparação das seqüências parciais de nucleotídeos dos genes 16s rRNA, *tccC*, *tcdA1* e *tcdA4* com as seqüências destes genes da linhagem W14 de *P. luminescens* subsp. *akhurstii*. O isolado foi denominado IB01.

2 - Os genes *tcdA1* e *tcdA4* de IB01 foram totalmente seqüenciados. A proteína TcdA1-IB01 apresentou identidade de 94,3 % com a proteína TcdA1-W14 e de 87,4 % com TcdA1-TT01. A proteína TcdA4-IB01 apresentou identidade de 90,3 % com a proteína TcdA4-W14 e de 86,2 % com a TcdA1-TT01.

3 - IB01 apresenta genes semelhantes aos *tccC1*, *tccC2* e *tccC3* da linhagem W14 e ao *tccC6* da linhagem TT01 e aos genes *mcf1* e *mcf2* de W14.

4 - Em IB01 foram encontrados dois genes pks com seqüências de aminoácidos semelhantes aos genes *plu 2312* e *plu 1880* de *P. luminescens* TT01.

5 - Os primers degenerados desenvolvidos no presente trabalho se mostraram de grande aplicação prática na investigação da presença de genes *tc* e *mcf* em outros isolados nativos de *P. luminescens*.

4 - O isolado IB01 apresenta toxicidade oral e injetável contra larvas do inseto *Galleria mellonella* e toxicidade injetável contra larvas do inseto *Diatraea saccharalis*.

5 - Clones de *E. coli* contendo genes *tcdA1*, *tcdA2* e *tcdA4* de *P. luminescens* IB01 mostraram toxicidade oral parcial à *G. mellonella* promovendo a redução no ganho de peso das larvas.

6 - A biblioteca genômica de cosmídeos obtida para *P. luminescens* IB01 facilitará a identificação, seqüenciamento e manipulação de novos genes com potencial biotecnológico.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-RAZEK, A. S. Pathogenic effects of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus luminescens* (Enterobacteriaceae) against pupae of the diamondback Moth, *Plutella xylostella* (L.) **J. Pest Science**, v. 76, p.108-111, 2003.
- AKHURST R. J. Neoplectana species: specificity of association with bacteria of the genus *Xenorhabdus*. **Exp Parasitol**, v. 55, n. 2, p. 258-63, 1983.
- ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W., LIPMAN, D. J., Basic local alignment search tool. **J Mol Biol**, v. 215, p. 403-410, 1990.
- BENNETT, H. P.J. & CLARKE, D.J. The pbgPE operon in *Photorhabdus luminescens* is required for pathogenicity and symbiosis. **J Bacteriol**, v. 187 n. 1, p. 77-84, 2005.
- BEYER S, KUNZE B, SILAKOWSKI B, MULLER R. Metabolic diversity in myxobacteria: identification of the myxalamid and the stigmatellin biosynthetic gene cluster of *Stigmatella aurantiaca* Sg a15 and a combined polyketide-(poly)peptide gene cluster from the epothilone producing strain *Sorangium cellulosum* So ce90. **Biochim Biophys Acta**. v. 1445, p.185-95, 1999.

BINTRIM, S. B.; ENSIGN, J. C. Insertional inactivation of genes encoding the crystalline inclusion proteins of *Photorhabdus luminescens* results in mutants with pleiotropic phenotypes. **J. Bacteriol**, v. 180, n. 5, p. 1261-1269, 1998.

BLACKBURN, M., GOLUBEVA, E., BOWEN, D., FFRENCH-CONSTANT, R.H. A novel insecticidal toxin from *Photorhabdus luminescens*, toxin complex A (Tca), and its histopathological effects on the midgut of *Manduca sexta*. **Appl Environ Microbiol**, v. 64, n. 8, p. 3036-3041, 1998.

BLACKBURN M. B., DOMEK, J. M., GELMAN, D. B., HU J. S. The broadly insecticidal *Photorhabdus luminescens* toxin complex a (Tca): Activity against the colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, and sweet potato whitefly, *Bemisia tabaci*. **J Insect Science**, v. 5, p. 32-43, 2005.

BOEMARE, N. E., AKHURST, R. J., MOURANT, R. G. DNA relatedness between *Xenorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae), symbiotic bacteria of entomopathogenic nematodes, and a proposal to transfer *Xenorhabdus luminescens* to a new genus, *Photorhabdus* gen. nov. **Int. J. Syst. Bacteriol**, v. 43, n. 2, p. 249-255, 1993.

BOFF, M.I.C.; WIEGERS, G. L.; GERRITSEN, L.J.M.; SMITS, P.H. Development of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis megidis* strain NLH-E 87.3 in *Galleria mellonella*. **Nematol**, v. 2, n. 3, p. 303-308, 2000.

BOTELHO, P.S.M. Quinze anos de controle biológico de *Diatraea saccharalis* utilizando parasitóides. **Pesq Agropec Bras**, v. 27, p. 255-262, 1992.

BOTELHO, P.S.M.; PARRA, J.R.P.; CHAGAS NETO, J.F., OLIVEIRA C.P.B. Associação do parasitóide de ovos *Trichogramma galloi* Zucchi (Hymenoptera: Trichogrammatidae) e do parasitóide larval *Cotesia flavipes* (Cam.) (Hymenoptera: Braconidae) no controle de *Diatraea saccharalis*, (Fabr.) (Lepidoptera: Crambidae) em cana-de-açúcar. **An. Soc. Entomol. Bras**, v. 28, n. 3, p. 491-496, 1999.

BOWEN, D.J. e ENSIGN, J.C. Purification and characterization of high-molecular-weight insecticidal protein complex produced by the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens*. **Appl Environ Microbiol** v. 64, n. 8, p. 3029-3035, 1998.

BOWEN, D., ROCHELEAU, T.A., BLACKBURN, M., ANDEEV, O. GOLUBEVA, E., BHARTIA, R., FFRENCH-CONSTANT, R. H. Insecticidal toxins from the bacterium *Photorhabdus luminescens*. **Science**, v. 280, p. 2129-2132, 1998.

BROWN, S. E., CAO, A. T., DOBSON, P., HINES, E. R., AKHURST, R. J., EAST, P. D. A novel secreted protein toxin from the insect pathogenic bacterium *Xenorhabdus nematophila*. **J Biol Chem**, v. 279, n. 15, p. 4595-14601, 2004.

- BROWN, S. E., CAO, A. T., DOBSON, P., HINES, E. R., AKHURST, R. J., EAST, P. D. Txp40, a ubiquitous insecticidal toxin protein from *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* bacteria. **Appl Environ Microbiol**, v. 72, n. 2, p. 1653-1662, 2006.
- BRUNEL, B., GIVAUDAN, A., LANOIS, A., AKHURST, R. J., BOEMARE, N. Fast and accurate identification of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* species by restriction analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. **Appl Environ Microbiol**, v. 63, n. 2, p. 574-580, 1997.
- CICHE, T. A., BINTRIM, S. B., HORSWILL, A. R., ENSIGN J. C. A phosphopantetheinyl transferase homolog is essential for *Photorhabdus luminescens* to support growth and reproduction of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora*. **J Bacteriol**, v. 183, n. 10, p. 3117-3126, 2001.
- CICHE, T. A. e ENSIGN J. C. For the insect pathogen *Photorhabdus luminescens*, which end of a nematode is out? **Environ Microbiol**, v. 69, n. 4, p.1890-1897, 2003.
- DABORN, P.J., WATERFIELD, N., BLIGHT, M. A., FFRENCH-CONSTANT, R. H. Measuring virulence factor expression by the pathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens* in culture and during insect infection. **J Bacteriol**, v. 183 n. 30, p. 5834-5839, 2001.

DABORN, P.J., WATERFIELD, N., SILVA, C.P., AU, C.P.Y., SHARMA, S., FFRENCH-CONSTANT, R. H. A single *Photorhabdus* gene, makes caterpillars floppy (mcf), allows *Escherichia coli* to persist within and kill insects. **Proc Nat Acad Sci**, v. 99, p. 10742-10747, 2001.

DUCHAUD, E., RUSNIOK, C., FRANGEUL, L., BUCHRIESER, C., GIVAUDAN, A., TAOURIT, S., BOCS, S., BOURSEAUX-EUDE, C., CHANDLER, M., CHARLES, J-F., DASSA, E., DEROSE, R., DERZELLE, S., FREYSSINET, G., GAUDRIALT, S., MÉDIGUE, C., LANOIS, A., POWELL, K., SIGUIER, P., VINCENT, R., WINGATE, V., ZOUINE, M., GLASER, P., BOEMARE, N., DANCHIN, A., KNUST, F. The genome sequence of the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens*. **Nature**, v. 21, n. 11, p. 1307-1313, 2003.

FARMER, J.J. 3RD, JORGENSEN, J.H., GRIMONT, P.A., AKHURST, R.J., POINAR, G.O. JR, AGERON, E., PIERCE, G.V., SMITH, J.A., CARTER, G.P., WILSON, K.L., et al. *Xenorhabdus luminescens* (DNA hybridization group 5) from human clinical specimens. **J Clin Microbiol**, v. 27, n. 7, p. 1594-1600, 1989.

FFRENCH-CONSTANT, R.H., WATERFIELD, N. BURLAND, V. PERNA, N.T., DABORN, P.J., BOWEN, D., BLATTNER, F.R. A genomic sample sequence of the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens* W14: potential implications for virulence. **Appl Environ Microbiol**, v. 66, n. 8, p. 3310-3329, 2000.

FFRENCH-CONSTANT, R., WATERFIELD, N., DABORN, P., JOYCE, S., BENNETT, H., AU, C., DOWLING, A., BOUNDY, S., REYNOLDS, S., CLARKE, D. *Photorhabdus*: towards a functional genomic analysis of a symbiont and pathogen. **FEMS Microbiol Rev**, v. 26, n. 5, p. 433-56, 2003.

FISCHER-LE SAUX, M., MAULÉON, H., CONSTANT P., BRUNEL, B., BOEMARE, N. PCR-ribotyping of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* isolates from the Caribbean region in relation to the taxonomy and geographic distribution of their nematode hosts. **Appl Environ Microbiol**, v. 64, n. 11, p. 4246-4254, 1998.

FISCHER-LE SAUX, M., VIALARD, V., BRUNEL, B. NORMAND, P., BOEMARE, N. E. Polyphasic classification of the genus *Photorhabdus* and proposal of new taxa: *P. luminescens* subsp. *luminescens* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *akhurstii* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *laumondii* subsp. nov., *P. temperata* sp. nov., *P. temperate* subsp. *temperate* subsp. nov., and *P. asymbiotica* sp. nov. **Int J Syst Bacteriol**, v. 49, p. 1645-1656, 1999.

FOLEGATTI, M. E. G., ALVES, S. B., KAWAI, P. R. C., BOTELHO, P. S. M. Nova metodologia para produção in vivo de *Neoplectana carpocapsae* Weiser. **Nematol Bras**, v. 12, p. 76-83, 1988.

FORST, S., DOWDS, B., BOEMARE, N., STACKEBRANDT, E. *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp. bugs that kill bugs. **Ann Rev Microbiol**, v. 51, p. 47-72, 1997.

FORST, S. e NEALSON, K. Molecular biology of the symbiotic-pathogenic bacteria *Xenorhabdus* spp and *Photorhabdus* spp. **Microbiol Rev**, v. 60, n. 1, p. 21-43, 1996.

GALLO, D., NAKANO, O., SILVEIRA NETO, S., CARVALHO, R.P.L., BATISTA, G.C., BERTI FILHO, E., PARRA, J.R.P., ZUCHHI, R.A., ALVES, S.B., VENDRAMIM, J.D. **Manual de entomologia agrícola**. São Paulo: Ed. Ceres, 649p.,1988.

GERRITSEN L.J.M., WIEGERS G.L., SMITS P.H. Pathogenicity of new combinations of *Heterorhabditis* spp. and *Photorhabdus luminescens* against *Galleria mellonella* and *Tipula oleracea*. **Biol. Control**, v. 13, n. 1, p. 9-15, 1998.

GUO, L., FATIG III, R. O., ORR, G. L., SCHAFER, B. W., STRICKLAND, J. A., SUKHAPINDA, K., WOODSWORTH, A., PETTEL, J. K. *Photorhabdus luminescens* W-14 insecticidal activity consist of at least two similar but distinct proteins. **J Biol. Chem**, v. 274, n. 14, p. 9836-9842, 1999.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl Acids Symp Ser**, v. 41, p. 95-98. 1999.

HAN R C, e EHLERS R-U. Pathogenicity, development, and reproduction of *Heterorhabditis* and *Steinernema carpocapsae* under axenic *in vivo* conditions. **J Invert Pathol**, v. 75, n. 1, p. 55-58, 2000

HAZIR, S., STACKEBRANDT, E., LANG, E., SCHUMANN, P., EHLERS, H-U., KESKIN, N. Two new subspecies of *Photorhabdus luminescens* isolated from *Heterorhabditis bacteriophora* (Nematoda: Heterorhabditidae): *Photorhabdus luminescens* subsp. *kayaii* subsp. nov. and *Photorhabdus luminescens* subsp. *thracensis* subsp. nov. **System Appl Microbio**, v. 27, p. 36-42, 2004.

HÖFTE, H. e WHITELY, H.R. Insecticidal crystal protein of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiol Rev**, v. 53, n. 2, p. 242-255, 1989.

HU, K., LI, J., LI, B., WEBSTER, J.M., CHEN, G. A novel antimicrobial epoxide isolated from larval *Galleria mellonella* infected by the nematode symbiont, *Photorhabdus luminescens* (Enterobacteriaceae). **Bioorg. & Med. Chem.** v. 4, p. 4677-4681, 2006.

KRASOMIL-OSTERFELD K. C. Influence of osmolarity on fase shift in *Photorhabdus luminescens*. **Appl Environ Microbiol**, v. 61, n. 10, p. 3748-3749, 1995.

JANSE, J. D. e SMIT, P. H. Whole cell fatty acid patterns of *Xenorhabdus* species. **Lett Appl Microbiol**, v. 10, p. 131-153, 1990.

LACEY, L. A., FRUTOS, R., KAYA, H.K., VAIL, P. Insect pathogens as biological control agents: Do they have a future? **Biol Control**, v. 21, p. 230-248, 2001.

LEITE, L. G., MACHADO, L. A., GOULART, R. M., TAVARES, F. M., BATISTA FILHO, A. Screening of entomopathogenic nematodes (Nematoda: Rhabditida) and the efficiency of *Heterorhabditis* sp. against the sugarcane root spittlebug *Mahanarva fimbriolata* (Fabr.) (Hemiptera: Cercopidae). **Neotrop Entomol**, v. 34, n. 5, p. 785-790, 2005.

LIMA FILHO, M. & DE LIMA, J. O. G. *Diatraea saccharalis* (Fabr.) em cana-de-açúcar na região norte do Estado do Rio de Janeiro: flutuação populacional e parasitismo de ovos por *Trichogramma* spp. **Rev Univers Rural, Série Ciências da Vida**, v. 22, n. 2, p. 33-44, 2003.

LIU, J., BERRY, R., POINAR, G., MOLDENKE, A. Phylogeny of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* species and strains as determined by comparison of partial 16S rRNA gene sequences. **Int J Syst Bacteriol**, v. 47, n. 4, p. 948-51, 1997.

LIU, D.; BURTON, S.; GLANCY, T. LI, Z., HAMPTON, R. MEADE, T., MERLO, D.J. Insect resistance conferred by 283-kDa *Photorhabdus luminescens* protein TcdA in *Arabidopsis thaliana*, **Nat Biotechnol**, v. 21, p. 1222-1228, 2003.

MACHADO, L. A., HABIB, M., LEITE, L. G., CALEGARI, R. M., GOULART, R. M., TAVARES, F. M. Patogenicidade de nematóides entomopatogênicos a ovos e

larvas de *Migdolus fyanus* (Westwood, 1863) (Coleóptera:Vesperidae). **Arq Inst Biol**, v. 72, n. 2, p. 221-226, 2005.

RAINEY, F.A., EHLERS, R.U., STACKEBRANDT, E. Inability of the polyphasic approach to systematics to determine the relatedness of the genera *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*. **Int J Syst Bacteriol**, v. 45, n. 2, p. 379-381, 1995.

RAJAGOPAL, R. e BHATNAGAR, R. J. Insecticidal toxic proteins produced by *Photorhabdus luminescens akhurstii*, a symbiont of *Heterorhabditis indica*. **J Nematol**, v. 34 1, p. 23-27, 2002.

SAMBROOK J. e RUSSEL D.W. **Molecular cloning. A laboratory manual**. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001.

SHARMA, S., WATERFIELD, N., BOWEN, D., ROCHELEAU, T., HOLLAND, L., JAMES, R., FFRENCH-CONSTANT, R. The lumicins: novel bacteriocins from *Photorhabdus luminescens* with similarity to the uropathogenic-specific protein (USP) from uropathogenic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol Lett**, v. 214, n. 2, p. 241-249, 2002.

SILVA, C. P., WATERFIELD, M., DABORN, P.J., DEAN, P., CHILVER, T., AU, C.P.Y., SHARMA, S., POTTER, U., REYNOLDS, S. E., FFRENCH-CONSTANT,

R. Bacterial infection of a model insect: *Photorhabdus luminescens* and *Manduca sexta*. **Cell Microbiol**, v. 4, p. 329-339, 2002.

SZÁLLÁS, E., KOCH, C., FODOR, A., BURGHARDT, J., BUSS, O., SZENTIRMAI A., NEALSON, K. H., STACKEBRANDT, E. Phylogenetic evidence for the taxonomic heterogeneity of *Photorhabdus luminescens*. **Int J Syst Bacteriol**, v. 47, p. 402-407, 1997.

THOMAS, G. M. e POINAR, G. O. *Xenorhabdus* gen. nov., a genus of entomopathogenic bacteria of the family Enterobacteriaceae. **Int J Syst Bacteriol**, v. 29, p. 352-360, 1979.

WATERFIELD, N. R., DABORN, P. J., FFRENCH-CONSTANT, R. H. Insect pathogenicity islands in the insect pathogenic bacterium *Photorhabdus*. **Physiol Entomol**, v. 29, p. 240-250, 2004.

WATERFIELD, N. BOWEN, D. J., FETHERSTON, J. D. PERRY, R. D., FFRENCH-CONSTANT, R. H. The *tc* genes of *Photorhabdus*: a growing family. **Trends Microbiol**, v. 9, n. 4, p. 185-191, 2001a.

WATERFIELD, M., DABORN, P.J., DOWLING, A., YANG, G., HARES, M., FFRENCH-CONSTANT, R. The insecticidal toxin makes caterpillars floppy 2 (Mcf2) shows similarity to HmA, an avirulence protein from a plant pathogen. **FEMS Microbiol Lett**, v. 229, n. 2, p. 265-3270, 2003.

WATERFIELD, N., DOWLING, A., SHARMA, S., DABORN, P.J., POTTER, U., FFRENCH-CONSTANT R.H. Oral toxicity of *Photobacterium luminescens* W14 toxin complexes in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, v. 67, n. 11, p. 5017-5024, 2001b.

WATERFIELD, M., HARES, M., YANG, G. DOWLING, A., FFRENCH-CONSTANT, R. Potentiation and cellular phenotypes of the insecticidal toxin complexes of *Photobacterium* bacteria. *Cell Microbiol*, v. 7, n. 3, p. 373-382, 2005.

WEISBURG, W. G., BARNS, S. M., PELLETIER, D. A., LANE, D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol*, v. 173, p. 697-703, 1991.

WENZEL, I.M., GIOMETTI, F.H.C., ALMEIDA, J.E.M. Patogenicidade do isolado IBCB 66 de *Beauveria bassiana* à broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* em condições de laboratório. *Arq Inst Biol*, v. 73, n. 2, p. 259-261. 2006.

WILLIAMS, J.S., THOMAS, M., CLARKE, D.J. The gene *stIA* encodes a phenylalanine ammonia-lyase that is involved in the production of a stilbene antibiotic in *Photobacterium luminescens* TT01. *Microbiol*, v. 151, p. 2543-2550, 2005.

