

Notas Científicas

Seleção e caracterização molecular de isolados de *Bacillus thuringiensis* para o controle de *Spodoptera* spp.

Kelly Christiane Constanski⁽¹⁾, Janaina Zorzetti⁽¹⁾, Gislayne Trindade Vilas Boas⁽¹⁾, Ana Paula Scaramal Ricieto⁽¹⁾, Fernanda Aparecida Pires Fazon⁽¹⁾, Laurival Vilas Boas⁽¹⁾, Rose Gomes Monnerat⁽²⁾ e Pedro Manuel Oliveira Janeiro Neves⁽¹⁾

⁽¹⁾Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Campus Universitário, Caixa Postal 10011, CEP 86057-970 Londrina, PR, Brasil. E-mail: kellyconstanski@gmail.com, jzorzetti@hotmail.com, gtvboas@gmail.com, ricietto@gmail.com, fernandafazon@gmail.com, laurival.vboas@gmail.com, pedroneves@uel.br ⁽²⁾Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Parque Estação Biológica, Avenida W5 Norte (Final), Caixa Postal 02372, CEP 70849-970 Brasília, DF, Brasil. E-mail: rose.monnerat@embrapa.br

Resumo – O objetivo deste trabalho foi selecionar e caracterizar molecularmente isolados de *Bacillus thuringiensis* tóxicos a *Spodoptera eridania* e *S. frugiperda*. Trinta e quatro isolados foram submetidos ao bioensaio, dos quais três foram selecionados e usados para a estimativa da CL₅₀. Os isolados selecionados não diferiram da linhagem padrão HD-1. Na caracterização molecular, identificou-se a presença dos genes *cry1* e *cry2*, nos isolados BR37 e BR94, e dos genes *cry4A*, *cry4B*, *cry10*, *cry11* e *cyt1* no isolado BR58, o que confirmou o perfil proteico obtido de 130, 70 e 65 kDa. Foram identificados cristais bipiramidais e esféricos. O isolado BR58, apesar de não conter os genes relacionados à toxicidade a Lepidoptera, causa mortalidade em ambas as espécies.

Termos para indexação: *Spodoptera eridania*, *Spodoptera frugiperda*, controle biológico, genes *cry*, proteínas Cry.

Selection and molecular characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates for controlling *Spodoptera* spp.

Abstract – The objective of this work was to select and molecularly characterize *Bacillus thuringiensis* isolates toxic to *Spodoptera eridania* and *S. frugiperda*. Thirty four isolates were subjected to the bioassay, of which three were selected and used to estimate the LC₅₀. The selected isolates did not differ from the HD-1 standard line. In the molecular characterization, the presence of the *cry1* and *cry2* genes was identified in the BR37 and BR94 isolates, and of the *cry4A*, *cry4B*, *cry10*, *cry11*, and *cyt1* genes in the BR58 isolate, which confirmed the obtained protein profile of 130, 70, and 65 kDa. Bipyramidal and spherical crystals were identified. The BR58 isolate, although not containing the genes related to toxicity to Lepidoptera, causes mortality in both species.

Index terms: *Spodoptera eridania*, *Spodoptera frugiperda*, biological control, *cry* genes, Cry proteins.

O gênero *Spodoptera* (Lepidoptera: Noctuidae) apresenta grande importância econômica, por englobar várias espécies capazes de causar danos a diversas culturas (Santos, 2007). No Brasil, a espécie *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) é considerada praga chave da cultura do milho, por causar perdas significativas na produção, especialmente pela voracidade das lagartas e pela sua ocorrência durante todos os estágios fenológicos da cultura (Santos, 2007). Já *Spodoptera eridania* (Cramer, 1782) é comumente encontrada na soja, e apresenta importância a partir do início da fase reprodutiva da cultura, quando se alimenta de folhas e vagens (Bueno et al., 2008).

A medida de controle mais utilizada no manejo de *Spodoptera* spp. é a aplicação de inseticidas sintéticos, que, muitas vezes, são utilizados de forma errônea e abusiva, o que causa danos ao homem e ao ambiente (Van Lenteren & Bueno, 2003). Entre as alternativas de controle que minimizam os problemas de contaminação ambiental, destaca-se a utilização de bioinseticidas formulados à base de *Bacillus thuringiensis*.

A bactéria *B. thuringiensis* (Bt) é o principal agente de controle biológico de insetos, principalmente em razão da descoberta de novos isolados com variado espectro de ação (Melo & Azevedo, 1998). Essa bactéria produz inclusões cristalinas, denominadas de proteínas Cry,

que são tóxicas a várias ordens de insetos (Monnerat & Bravo, 2000). Atualmente, 743 genes *cry*, classificados em 73 grupos de proteínas Cry, com diferentes subdivisões, encontram-se clonados e sequenciados (Crickmore et al., 2014). Apesar da grande quantidade de genes descritos e de sua grande diversidade, o número de proteínas ativas para o controle de uma determinada praga pode ser muito limitado (Herrero et al., 2002). Portanto, o interesse pela busca de novos isolados e novos genes tem se mantido constante.

O objetivo deste trabalho foi selecionar e caracterizar molecularmente isolados de *B. thuringiensis* tóxicos a *S. eridania* e *S. frugiperda*.

Foram avaliados 34 isolados de *B. thuringiensis* pertencentes ao Banco de Entomopatógenos do Laboratório de Genética e Taxonomia de Bactérias da Universidade Estadual de Londrina e da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Os isolados foram recebidos na forma liofilizada e recuperados em solução aquosa de Tween 20 (0,05% v/v), na concentração de 10.000 µg mL⁻¹ (0,03 g em 3,0 mL de água destilada esterilizada). Após a obtenção da solução, esta foi agitada em aparelho do tipo Vortex, por 60 s.

As lagartas de *S. eridania* e *S. frugiperda* foram cedidas pela Embrapa Soja. Em todos os testes, foram utilizadas lagartas de segundo instar e folhas de milho com 40 dias de emergência, produzidas em casa de vegetação, sem aplicação de produtos fitossanitários. Para o bioensaio seletivo, as folhas foram previamente desinfetadas com solução de hipoclorito (1%), cortadas (2,25 cm²) e, após secagem, imersas na suspensão descrita anteriormente. Na testemunha, as folhas de milho foram imersas apenas na solução aquosa de Tween 20 (0,05% v/v). As lagartas foram individualizadas, para evitar o canibalismo, e o experimento foi acondicionado em câmara climatizada (25±1°C e fotofase de 12 horas). As avaliações de mortalidade foram realizadas 24, 48 e 72 horas após a aplicação dos tratamentos. Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, com cinco repetições de 20 lagartas.

Os isolados responsáveis por mortalidades maiores que 90%, para ambas as espécies, foram submetidos a bioensaios de dose-resposta para estimativa da CL₅₀. Sete doses foram testadas: 0,015 (p/v), 156 µg mL⁻¹; 0,03 (p/v), 312 µg mL⁻¹; 0,06 (p/v), 625 µg mL⁻¹; 0,12 (p/v), 1.250 µg mL⁻¹; 0,25 (p/v), 2.500 µg mL⁻¹; 0,5

(p/v), 5.000 µg mL⁻¹; e 1,0 (p/v), 10.000 µg mL⁻¹. Os isolados foram comparados à linhagem padrão HD-1, de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*. Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, com cinco repetições de 20 lagartas. Os dados de mortalidade foram submetidos à análise de Probit, tendo-se utilizado a sobreposição do intervalo de confiança de 95%.

Amostras de DNA genômico dos isolados foram extraídas pelo método de Hansen & Hendriksen (2001). Os isolados foram cultivados em placas de acrílico com meio Luria-Bertani (triptona 1,0%, extrato de levedura 0,5% e NaCl 1,0%), a 30°C, por 16 horas. Com o auxílio de um palito esterilizado, transferiu-se uma colônia, com aproximadamente 2,0 mm de diâmetro, para microtubos com 200 µL de TE (10 mmol L⁻¹ de Tris; 1,0 mmol L⁻¹ de EDTA; pH 8,0). A suspensão foi homogeneizada e incubada em fervura por 10 min. Em seguida, a suspensão foi centrifugada a 12.000 g, por 3 min, e o sobrenadante foi transferido para novos tubos e estocado a 4°C, para análises posteriores nas reações de amplificação por PCR.

A presença dos genes *cry1*, *cry2*, *cry3*, *cry4A*, *cry4B*, *cry10*, *cry11* e *cyt1* foi averiguada com os iniciadores e as condições de amplificação específicas, descritos na literatura (Cerón et al., 1995; Bravo et al., 1998; Ibarra et al., 2003). As reações de amplificação foram conduzidas com volume total de 20 µL, com 1,0 U de *Taq* DNA polimerase (Life Technologies do Brasil Ltda., São Paulo, SP), tampão (2,0 mmol L⁻¹ Tris-HCl pH 8,0, 5,0 mmol L⁻¹ de KCl), 2,5 mmol L⁻¹ de MgCl₂, 0,25 mmol L⁻¹ de dNTP, 0,5 µmol L⁻¹ de cada iniciador, 2,0 µL do DNA genômico e água Milli-Q esterilizada. Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,2%, em tampão TBE (89 mmol L⁻¹ Tris Borato, 2,0 mmol L⁻¹ EDTA, pH 8,0), e corados com SYBR Safe (Life Technologies do Brasil Ltda., São Paulo, SP). Para a comparação do peso molecular das bandas de amplificação, utilizou-se o marcador de 1 Kb DNA Plus Ladder (Life Technologies do Brasil Ltda., São Paulo, SP).

A caracterização proteica dos isolados de *B. thuringiensis* foi realizada por eletroforese de proteína, em gel de poliacrilamida (10%) SDS-PAGE. Os cristais foram obtidos de acordo com o protocolo descrito por Lecadet et al. (1992). Cada isolado foi cultivado em meio nutriente (NB), a 30°C, por 72 horas, sob agitação de 200 rpm.

A caracterização morfológica dos isolados foi feita de acordo com suas inclusões proteicas, avaliadas por microscopia eletrônica de varredura. Para tanto, uma alíquota de cada isolado liofilizado foi depositada sobre suportes metálicos e coberta com ouro, por 180 s, com corrente de 40 mA, com uso de metalizador Emitech, modelo K550 (Quorum Technologies Ltd., Lewes, East Sussex, Reino Unido). As amostras foram observadas em microscópio eletrônico de varredura Zeiss DSM 962 (Carl Zeiss International, Oberkochen, Alemanha).

Dos 34 isolados de *B. thuringiensis* avaliados, três (BR37, BR58, BR94) foram responsáveis por mortalidade superior a 90%, para ambas as espécies de *Spodoptera* (Tabela 1). Esses isolados foram selecionados para determinação da CL₅₀. Os valores de CL₅₀ dos três isolados não diferiram estatisticamente dos obtidos para a linhagem padrão *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 (Tabela 2). Esse resultado é indicativo de elevado potencial tóxico dos isolados, uma vez que a linhagem utilizada para comparação pode apresentar toxicidade de 2 a 200 vezes maior do

que a de outras linhagens normalmente utilizadas em produtos comerciais (Dulmage, 1970).

A caracterização molecular revelou que os isolados BR37 e BR94 apresentam os genes *cry1* e *cry2* (Figura 1), assim como a linhagem padrão HD-1. No isolado BR58, foi verificada a presença dos genes *cry4A*, *cry4B*, *cry10*, *cry11* e *cyt1* (Figura 2).

Observaram-se valores de massas moleculares de 130 e 65 kDa para o isolado BR37 (Figura 3). Esses valores são característicos das proteínas Cry1 e Cry2, respectivamente; esse mesmo perfil proteico foi confirmado para a linhagem padrão HD-1. Já o isolado BR58 apresentou perfil proteico relacionado às proteínas Cry4A, Cry4B, Cry10, Cry11 e Cyt1, com massas moleculares de 130 e 70 kDa. Para o isolado BR94, somente o valor de massa molecular de 65 kDa foi confirmado, que corresponde à proteína Cry2, embora tenha-se identificado a presença do gene *cry1*, na caracterização gênica. Isto pode ser explicado pela não expressão, ou pela subexpressão, dessa proteína (Macedo et al., 2012).

Quanto à morfologia dos cristais, também útil para avaliação da atividade inseticida dos isolados, foram observados cristais bipiramidais, no isolado BR94; cristais esféricos, no isolado BR58; e cristais bipiramidais e esféricos, no isolado BR37. A linhagem padrão HD-1 apresentou cristais bipiramidais, cuboídes e esféricos. Os cristais bipiramidais são frequentemente relacionados à presença de proteínas do tipo Cry1,

Tabela 1. Mortalidade (%) causada pelos diferentes isolados de *Bacillus thuringiensis* nos bioensaios seletivos com lagartas de segundo instar de *Spodoptera eridania* e *S. frugiperda*⁽¹⁾.

Isolados	<i>Spodoptera eridania</i>	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Isolados	<i>Spodoptera eridania</i>	<i>Spodoptera frugiperda</i>
BR06	86a	72b	S325	31f	54d
BR14	67c	11fg	S390	22f	76b
BR16	87a	17fg	S545	9fg	72bc
BR26	48e	52d	S550	2g	*
BR36	82b	14g	S1122	69c	6g
BR37	96a	96a	S1264	8fg	86a
BR40	67c	63c	S1269	100a	70c
BR46	68c	16g	S1342	3g	64c
BR48	86ab	51de	S1365	13fg	61cd
BR56	62c	58d	S1534	6g	10fg
BR58	94a	94a	S1538	22f	*
BR79	74b	68c	S1552	1g	*
BR87	54d	7g	S1704	0g	*
BR94	93a	88a	S1834	0g	*
BR128	56d	*	S1975	27f	*
BR138	71c	55d	S1989	77f	48e
BR139	72bc	60c	HD-1	100a	100a
S139	22f	98a	Testemunha	0g	0g

⁽¹⁾Médias seguidas de letras iguais não diferem pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. *Isolados não foram testados para *S. eridania*.

Tabela 2. Toxicidade (CL₅₀) dos isolados de *Bacillus thuringiensis* em lagartas de segundo instar de *Spodoptera eridania* e *S. frugiperda*, 72 horas após a incubação⁽¹⁾.

Isolado	CL ₅₀	Intervalo de confiança	χ^2	Regressão
<i>Spodoptera eridania</i>				
HD-1	0,14a	0,11–0,18	5,83	Y = 6,58 + 1,888log X
BR37	0,18a	0,14–0,25	9,62	Y = 6,43 + 1,974log X
BR58	0,14a	0,10–0,19	13,91	Y = 6,75 + 2,034log X
BR94	0,19a	0,17–0,23	3,09	Y = 6,45 + 2,038log X
<i>Spodoptera frugiperda</i>				
HD-1	0,13a	0,19–0,52	13,60	Y = 6,72 + 1,963log X
BR37	0,35ab	0,24–0,47	20,92	Y = 6,23 + 2,723log X
BR58	0,12a	0,08–0,17	14,59	Y = 6,83 + 1,995log X
BR94	0,24ab	0,16–0,32	9,66	Y = 6,50 + 2,463log X

⁽¹⁾Médias seguidas de letras iguais não diferem pela sobreposição do intervalo de confiança, a 95% probabilidade, de acordo com a análise de Probit.

eficazes contra insetos das ordens Lepidoptera e Coleoptera, enquanto os cristais cuboideis estão associados às proteínas Cry2 e Cry3, tóxicas contra

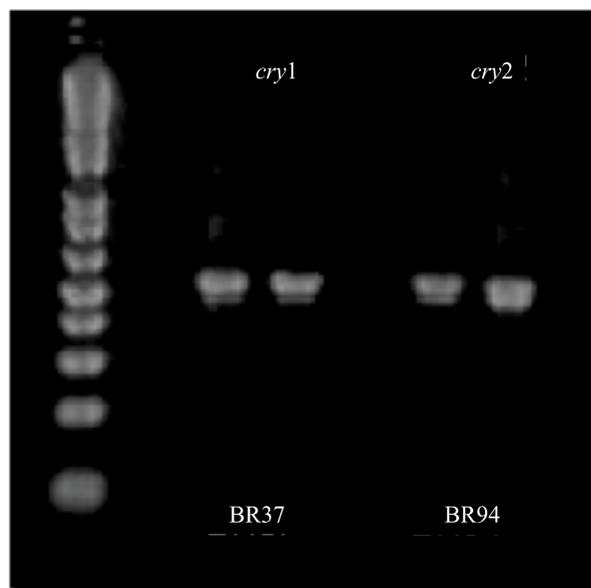


Figura 1. Reação de amplificação por PCR dos genes *cry1* e *cry2* com tamanhos esperados de 500 pb. Gel de agarose 1,2. Marcador de peso molecular 100 pb Ladder (Life Technologies do Brasil Ltda., São Paulo, SP).

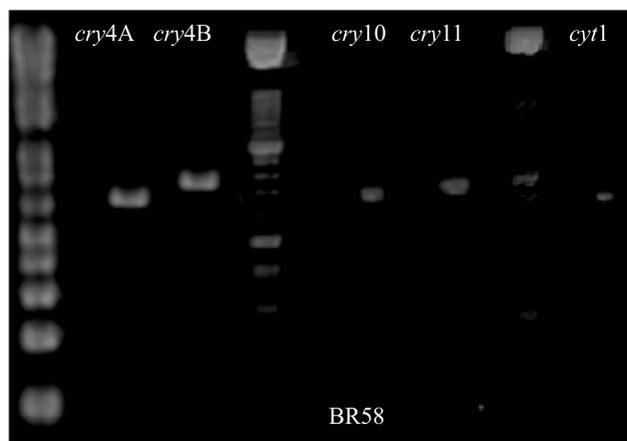


Figura 2. Reação de amplificação por PCR com tamanho esperado dos genes: *cry4A*, 459 pb; *cry4B*, 480 pb; *cry10*, 348 pb; *cry11*, 352 pb; e *cry1*, 480 pb. Gel de agarose 1,2. Marcador de peso molecular 100 pb Ladder (Life Technologies do Brasil Ltda., São Paulo, SP).

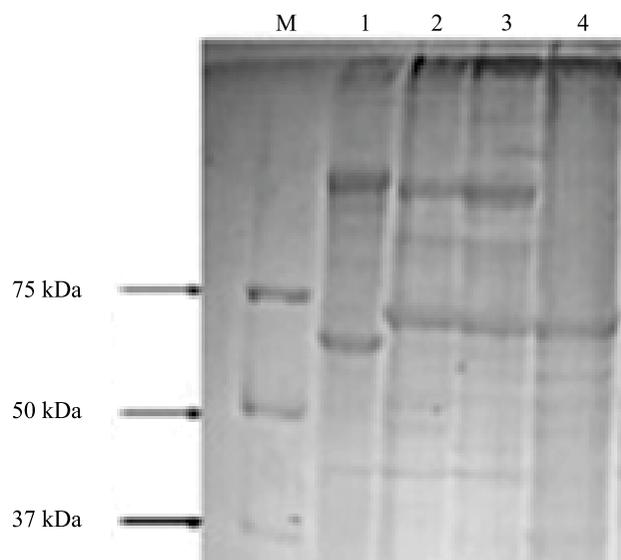


Figura 3. Gel de poliacrilamida (10%) SDS-PAGE de suspensão de esporos e cristais dos isolados de *Bacillus thuringiensis*. M, marcador; 1, HD-1; 2, BR37; 3, BR58; e 4, BR94.

lepidópteros, coleópteros e dípteros (Silva et al., 2004). Cristais esféricos estão associados às proteínas tóxicas contra dípteros (Melatti et al., 2005).

Novas formulações de bioinseticidas à base de isolados de *B. thuringiensis* podem ajudar no manejo da resistência de insetos-praga, e os resultados obtidos no presente trabalho revelam a possibilidade de obtenção de novos isolados e genes com grande potencial de controle das espécies de *Spodoptera* avaliadas.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão de bolsa e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, processo 481460/2008-0), pelo apoio financeiro.

Referências

BRAVO, A.; SARABIA, S.; LOPEZ, L.; ONTIVEROS, H.; ABARCA, C.; ORTIZ, A.; ORTIZ, M.; LINA, L.; VILLALOBOS, F.J.; PENA, G.; NUNEZ-VALDEZ, M.E.; SOBERON, M.; QUINTERO, R. Characterization of *cry* genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p.4965-4972, 1998.

- BUENO, R.C.O. de F.; CARNEIRO, T.R.; PRATISSOLI, D.; BUENO, A. de F.; FERNANDES, O.A. Biology and thermal requirements of *Telenomus remus* reared on fall armyworm *Spodoptera frugiperda* eggs. **Ciência Rural**, v.38, p.1-6, 2008. DOI: 10.1590/S0103-84782008000100001.
- CERÓN, J.; ORTÍZ, A.; QUINTERO, R.; GUERECIA, L.; BRAVO, A. Specific PCR primers directed to identify *cryI* and *cryIII* genes within a *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied Environmental Microbiology**, v.61, p.3826-3831, 1995.
- CRICKMORE, N.; BAUM, J.; BRAVO, A.; LERECLUS, D.; NARVA, K.; SAMPSON, K.; SCHENPF, E.; SUN, M.; ZEIGLER, D.R. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. 2014. Available at: <http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/>. Accessed on: 14 Jan. 2015.
- DULMAGE, H.T. Insecticidal activity of HD-1, a new isolate of *Bacillus thuringiensis* var. *alesti*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.15, p.232-239, 1970. DOI: 10.1016/0022-2011(70)90240-5.
- HANSEN, B.M.; HENDRIKSEN, N.B. Detection of enterotoxigenic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis. **Applied Environmental Microbiology**, v.67, p.185-189, 2001. DOI: 10.1128/AEM.67.1.185-189.2001.
- HERRERO, S.; BORJA, M.; FERRÉ, J. Extent of variation of the *Bacillus thuringiensis* toxin reservoir: the case of the geranium bronze, *Cacyreus marshalli* Butler (Lepidoptera: Lycaenidae). **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.4090-4094, 2002. DOI: 10.1128/AEM.68.8.4090-4094.2002.
- IBARRA, J.E.; RINCÓN, M.C. del; ORDÚZ, S.; NORIEGA, D.; BENINTENDE, G.; MONNERAT, R.; REGIS, L.; OLIVEIRA, C.M.F. de; LANZ, H.; RODRIGUEZ, M.H.; SÁNCHEZ, J.; PEÑA, G.; BRAVO, A. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Latin America with insecticidal activity against different mosquito species. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, p.5269-5274, 2003. DOI: 10.1128/AEM.69.9.5269-5274.2003.
- LECADET, M.M.; CHAUFAX, J.; RIBIER, J.; LERECLUS, D. Construction of novel *Bacillus thuringiensis* strains with different insecticidal activities by transduction and transformation. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, p.840-849, 1992.
- MACEDO, C.L. de; MARTINS, É.S.; MACEDO, L.L.P. de; SANTOS, A.C. dos; PRAÇA, L.B.; GÓIS, L.A.B. de; MONNERAT, R.G. Seleção e caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* eficientes contra a *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.47, p.1759-1765, 2012. DOI: 10.1590/S0100-204X2012001200012.
- MELATTI, V.; BATISTA, A.; DEMO, C.; PRAÇA, L.; BROD, C.; MONNERAT, R.G. **Determinação da susceptibilidade de *Spodoptera frugiperda* a diferentes subespécies de *Bacillus thuringiensis***. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005. 14p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 88).
- MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Controle biológico**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 1998. 264p. (EMBRAPA-CNPMA. Documentos, 11).
- MONNERAT, R.G.; BRAVO, A. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. In: MELO, I.S. de; AZEVEDO, J.L. (Ed.). **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. v.3, p.163-192.
- SANTOS, W.J. Manejo das pragas do algodão com destaque para o Cerrado Brasileiro. In: FREIRE, E.C. (Ed.). **Algodão no Cerrado do Brasil**. Brasília: Associação Brasileira dos Produtores de Algodão, 2007. p.403-521.
- SILVA, S.M.B. da; SILVA-WERNECK, J.O.; FALCÃO, R.; GOMES, A.C.; FRAGOSO, R.R.; QUEZADO, M.T.; OLIVEIRA NETO, O.B.; SÁ, M.F.G. de; BRAVO, A.; MONNERAT, R.G. Characterization of novel Brazilian *Bacillus thuringiensis* strains active against *Spodoptera frugiperda* and other insect pests. **Journal of Applied Entomology**, v.128, p.102-107, 2004. DOI: 10.1046/j.1439-0418.2003.00812.x.
- VAN LENTEREN, J.C.; BUENO, V.H.P. Augmentative biological control of arthropods in Latin America. **BioControl**, v.48, p.123-138, 2003. DOI: 10.1023/A:1022645210394.

Recebido em 10 de fevereiro de 2015 e aprovado em 26 de junho de 2015