

Caracterização Molecular de Cepas de *Bacillus thuringiensis* Berliner [Previous](#) [Top](#) Para o Biocontrole da Lagarta-do-cartucho do Milho [Next](#)



XXV Congresso Nacional de Milho e Sorgo - 29/08 a 02/09 de 2004 - Cuiabá - Mato G

BOREGAS, K.G.B., GUIMARÃES, C. T., VALICENTE, F. H. LOGUERCIO, L. L. e PAIVA, E.

Embrapa Milho e Sorgo. Caixa Postal 151,
Sete Lagoas, MG 35 700 – 970
Kgboregas@hotmail.com

Palavras-chave: *Bacillus thuringiensis*, *Spodoptera frugiperda*, *cry*, δ -endotoxinas, controle biológico.

INTRODUÇÃO

A bactéria *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) tem como habitat natural o solo; suas células apresentam forma de bastonetes, podendo ser aeróbicas ou anaeróbicas facultativas, formam esporos e produzem toxinas e enzimas (Dequech, 2000). A atividade entomopatogênica desse microrganismo se deve à presença de inclusão cristalina produzida durante a esporulação (Lereclus et al., 1993). Um cristal protéico intracelular é conhecido como pró-toxina, que após a sua dissolução em meio alcalino resulta em moléculas tóxicas tais como as δ -endotoxinas ou proteínas cristal (*Cry*). Estas proteínas apresentam atividade altamente tóxica contra larvas de insetos das ordens Lepidoptera, Diptera e Coleoptera, sendo inócuas para o homem, vegetais, animais e outros invertebrados. Assim, apenas insetos com pH intestinal alcalino são suscetíveis a este patógeno (Dequech, 2000). Na cultura do milho, a *Spodoptera frugiperda* (Smith 1997) é ainda a principal praga, com característica de um polífago noctuídeo causador das maiores perdas. Essas perdas são, geralmente, de maneira indireta, ou seja, através dos danos nas folhas, que variam com o estágio de desenvolvimento e do tipo de milho (Carvalho, 1970; Cruz, 1980; Cruz & Turpin, 1982; 1983; Cruz et al., 1996; 1999). Entre os agentes de controle biológico, os inseticidas a base de *Bt* devem aumentar, à medida que legislações voltadas à proteção ambiental mais rigorosa forem adotadas e produtos biológicos mais eficientes e baratos forem disponibilizados (Dias, 1992). Da mesma forma, plantas geneticamente modificadas contendo genes de *Bt* que expressem as δ -endotoxinas em locais específicos da planta, ou em etapas específicas do desenvolvimento, são alternativas biotecnológicas viáveis para o controle biológico de insetos-praga (Loguercio et al., 2002). Nesse contexto, a identificação de genes *cry* que apresentem maior potencial de utilização nas condições tropicais do Brasil, a partir de experimentos de escrutínio que associam ensaios de mortalidade com PCR, surge como alternativa para viabilizar a implementação dessas estratégias (Loguercio et al., 2001). O objetivo deste trabalho foi verificar a potencialidade do emprego de cepas de *Bacillus thuringiensis*, coletadas nas diversas regiões do Brasil, no controle biológico de lagartas de *Spodoptera frugiperda*, e caracterizar estes isolados molecularmente, por meio da técnica de PCR, quanto a presença de genes *cry1* em relação a maior ou menor eficiência na mortalidade deste inseto-praga.

MATERIAL E MÉTODOS

Os isolados de *Bt* utilizados neste estudo foram coletados a partir de amostras de solos de diferentes regiões geográficas brasileiras, e armazenados a -80°C no Laboratório de Controle Biológico da Embrapa Milho e Sorgo (Barreto et al., 1999). Foram avaliadas 83 cepas das regiões Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul, quanto à eficiência no controle da lagarta-do-cartucho do milho. Nos bioensaios foram utilizadas lagartas de *S. frugiperda* sadias com 2 dias de idade, e criadas em laboratório com dieta artificial. A grande maioria dos isolados aqui utilizados diferiram daqueles utilizados previamente, nas mesmas condições (Loguercio et al., 2001). A ação entomocida dos cristais de cada isolado testado foi verificada em experimentos com três repetições, sendo cada uma representada pelo percentual de mortalidade de 24 lagartas, crescidas em recipientes individuais de 50 mL com tampa, cada um contendo um pedaço de dieta artificial embebida na suspensão de esporos e cristais do respectivo isolado. Para a caracterização molecular dessas cepas de *Bt*, foram utilizados *primers* específicos para a amplificação dos genes *cryI* de Lepidópteros descritos por Cerón et al. (1994; 1995). As cepas de *Bt* foram crescidas em meio TB por 24 horas, a 30°C sob agitação constante a 250 rpm. O DNA plasmidial de cada cepa foi extraído pela técnica de *miniprep* com lise alcalina (Sambrook et al., 1989). As PCRs para cada tratamento 'isolado/par de *primers*' utilizaram 50 ng de DNA plasmidial do isolado, 2,5 mM de MgCl₂, 0,5 µM de cada um dos *primers* específicos, 500 mM de cada um dos dNTPs, e 0,5 U da enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies), em um volume final de 20 µL. O perfil de temperaturas para as reações de amplificação foi de uma desnaturação inicial de 95°C por 2 min, seguida de 30 ciclos de 94°C por 30 s, 52°C por 45 s, e 72°C por 1 min, acrescidos de uma extensão final a 72°C por 5 min. As cepas foram identificadas de acordo com presença e ausência dos fragmentos de DNA amplificados para cada par de *primer* em gel de agarose a 3 %, em TBE 0,5 X a 100 V por 180 a 210 minutos. Os géis foram tratados com brometo de etídio e as imagens processadas no Eagle Eye (Stratagene). O tamanho dos produtos amplificados foram calculados em função da comparação com o marcador DNA-*ladder* de 25 pb (Invitrogen Life Technologies). Modelos de análise de regressão linear simples e múltipla foram utilizados nas estatísticas referentes aos níveis de mortalidade em relação à presença de bandas (*cryI*) específicas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A caracterização das cepas de *Bt* foi realizada a partir do isolamento de colônias provenientes de amostras de solo de diferentes habitats, de cada Estado da União, sendo a esporulação e a formação dos cristais observadas e confirmadas em microscópio óptico. Nos resultados dos bioensaios, as 83 cepas de *Bt*, isoladas de diferentes regiões do Brasil, apresentaram índice de mortalidade variando de 0 a 100%, indicando a existência de uma elevada variabilidade para a entomopatogenicidade contra *S. frugiperda*. As cepas consideradas como eficientes foram aquelas que apresentaram o índice de mortalidade contra a lagarta-do-cartucho superior a 75% (Loguercio et al., 2001), tendo sido encontradas cepas eficientes em todas as regiões brasileiras amostradas (NE, SE, S e CO; Tabela 1).

Tabela 1. Isolados de *Bt* com níveis de mortalidade de *Spodoptera frugiperda* acima de 75%.

Isolados	Mortalidade (%)	Estados	Isolados	Mortalidade (%)	Estados
35E	75,0	BA	520B	95,6	MG
1092B	75,0	MG	1089EK	95,8	MG
1039C	75,0	GO	1091H	95,8	MG
939F	76,2	MG	1089EL	95,8	MG
1109D	77,2	GO	436	96,0	CE
1091A	78,2	MG	703K	97,6	MS
1124A	78,2	GO	5462A	100	PR
1091C	79,0	MG	460L	100	PR
1074D	79,1	MG	474L	100	PR
1091B	79,2	MG	701	100	SP
1092A	81,8	MG	701A	100	SP
1121D	82,6	GO	1119C	100	GO
1119B	85,7	GO	566BLR	100	?
1090F	85,7	MG	702L	100	MG
1121C	86,3	GO	T09	100	França
1090B	94,7	MG	HD125	100	USA
461A	95,5	PR			

Pelas análises de PCR, observou-se que 75,6% das cepas apresentaram o fragmento amplificado de 130 pb representando o gene *cryIC*, indicando ser este gene muito freqüente no germoplasma tropical de *Bt*. Apesar dos resultados de Cerón et al. (1995) indicarem que a proteína Cry1C é muito tóxica para lagarta da *S. frugiperda*, das 63 cepas contendo esse gene *cry*, apenas 26 cepas (41,4%) apresentaram mortalidade acima de 75%, sendo que a maioria delas também apresentava outros genes. O gene *cryIB* foi detectado em 25 cepas, sendo que 15 destas (60,0%) apresentaram o índice de mortalidade acima de 75%. A presença do gene *cryIC* explicou 17,5% da variação fenotípica para o índice de mortalidade das cepas (Tabela 2). Das 83 cepas de *Bt* estudadas, o gene *cryID* foi identificado em 21, das quais 19 (90,5%) apresentaram mortalidade acima de 75%, e dentre as 29 cepas que continham o gene *cryIE*, 23 (79,3%) apresentaram estes índices elevados de mortalidade. Considerando que a maioria das cepas apresentaram mais de um gene, foi necessário verificar os efeitos da presença individual e combinada dos mesmos, utilizando-se modelos lineares para análise estatística. Após as análises de regressão simples e múltipla, os genes *cryID* e *cryIE* foram significativamente associados com o índice de mortalidade das larvas de *S. frugiperda*, explicando 29,2 e 41,5 % da variação fenotípica da característica, respectivamente (Tabela 2). Estes resultados são importantes na medida que confirmaram a eficiência deste método de escrutínio por *crys* mais eficientes, conforme análises semelhantes realizadas em outro conjunto de 60 isolados tropicais, amplamente distribuídos em solos brasileiros (Loguercio et al., 2001); neste estudo, a presença do gene *cryIE* também foi altamente correlacionada (35%) com a mortalidade de lagartas de *S. frugiperda*. Além disso, os resultados aqui obtidos para os genes *cryID* e *IE* corroboraram informações encontradas em diferentes sistemas, nos quais ambos os genes foram considerados como os mais eficientes no controle de *S. frugiperda* em laboratório (Bohorova et al., 1997).

Tabela 2. Análise de regressão linear para avaliar a associação entre presença dos genes *cryI* em cepas de *Bt* e a sua eficiência no controle da lagarta-do-cartucho do milho.

Genes	Regressão Linear Simples				Regressão Linear Múltipla		
	R ²	F	P	Nº Obs.	F	P	R ² total
IE	17,5	5,9	0,0216	30	-	-	-
ID	26,0	29,2	< 0,0001	83	8,8	0,0039	-
IE	33,0	41,5	< 0,0001	83	18,8	< 0,0001	39,0

O gene *cryIAb* esteve presente em 16 cepas e o gene *cryIAa* amplificou positivamente em 17 cepas, sendo que estas cepas no geral apresentaram níveis de mortalidade considerados médios ou baixos (< 75%). De forma semelhante, em 27 cepas foram detectadas a presença do gene *cryIF*, apenas oito cepas apresentaram *cryIG* e nenhuma apresentou o gene *cryIAc*. Resultados semelhantes em relação a estes genes foram também encontrados por Valicente et al. (2000), avaliando 23 cepas *Bt* consideradas eficientes no controle da lagarta-do-cartucho de milho. Como este trabalho procurou investigar aspectos básicos e preliminares relativos à presença e distribuição de genes *cry* em germoplasma tropical, não foi realizada análise de regressão, já que o nº de amostras total foi pequeno e somente avaliaram-se isolados previamente definidos como eficientes. Tomados em conjunto, os resultados deste trabalho confirmaram dados previamente obtidos que indicam que (i) há elevada plasticidade genética (de δ -endotoxinas) e fenotípica (níveis de entomocidade) em germoplasma tropical de *Bt*, (ii) a associação de bioensaios de mortalidade e PCR serve como metodologia eficiente de escrutínio preliminar de coleções de *Bt*, buscando cepas e, ou genes com maior potencial de aplicação em biocontrole de insetos-praga, e (iii) que o gene *cryIE* tem papel diferenciado em relação a maior eficiência no controle biológico de *S. frugiperda*. Além disso, foi também indicada a importância do gene *cryID* nesse contexto de biocontrole, sugerindo estudos mais aprofundados desses dois genes e suas potenciais aplicações em estratégias, biotecnológicas ou convencionais, de controle biológico da lagarta-do-cartucho do milho.

LITERATURA CITADA

Barreto, M.R., Loguercio, L.L., Valicente, F.H., Paiva, E. 1999. Insecticidal activity of culture supernatants from *Bacillus thuringiensis* Berliner strains against *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. *An. Soc. Entomol. Brasil.* 28:675-685.

Bohorova, N., M. Cabrera, C. Abarca, R. Quintero, A.M. Maciel, R.M. Brito, D. Hoisington; A. Bravo. 1997. Susceptibility of four tropical maize pests to *Bacillus thuringiensis* CryI-type insecticidal toxins. *Biol. Microbiol. Cont.* 90: 412-415.

Carvalho, R.P.L. 1970. Danos, flutuação da população, controle e comportamento de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) e susceptibilidade de diferentes genótipos de milho em condições de campo. Piracicaba, Brasil, ESALQ, 170p. (Tese de Doutorado)

Cruz, I. 1980. Impact of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Smith and Abbot 1797) on grain yield in field corn. West Lafayette: Purdue University, p. 162. Tese de Mestrado.

Cruz, I., F.T. Turpin. 1982. Efeito da *Spodoptera frugiperda* em diferentes estágios de crescimento da cultura do milho. *Pesquisa Agropecuária Brasileira.*, Brasília v. 17, n. 3, p. 355-359.

Cruz, I., F.T. Turpin. 1983. Yield impact of larval infestation of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) to mid-whorl growth stage of corn. *Journal of Economic Entomology*, College Park, v. 76, n. 5, p. 1052-1054.

Cruz, I., L.J. Oliveira, A.C. Oliveira & C.A. Vasconcelos. 1996. Efeito do nível de saturação de alumínio em solo ácido sobre os danos de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) em milho. *Na. Soc. Entomol. Brasil* 25:293-297.

Cruz, I., M.L.C. Figueredo, A.C. Oliveira, C.A. Vasconcelos. 1999. Damage of *Spodoptera frugiperda* (Smith) in different maize genotypes cultivated in soil under three levels of aluminium saturation. *International Journal of Pest Management.* v. 44.

Cerón, J. L. Covarrubias, R. Quintero, A. Ortiz, M. Ortiz, E. Aranda, L. Lina & A. Bravo. 1994. PCR analysis of the cry I insecticidal crystal family genes from *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:353-356.

Cerón, J., A. Ortiz, R. Quintero, L. Güereca e A. Bravo. 1995. Specific PCR primers directed to identify cry I and cry III genes within a *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Applied and Environmental Microbiology.* v. 61, p. 3826-3831.

Dequech, S.T.B. 2000. Controle microbiano. In: Bases e técnicas do manejo de insetos. Santa Maria: UFSM/CCR/DFS; Palotti. 2000. p. 71-84.

Dias, J.M.C.S. 1992. Produção e utilização de bioinseticidas bacterianos. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 27, p.59-76.

Lereclus, D., Delécluse, A. and Lecadet, M.M. 1993. Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. In: Entwistle, P.F., J.S. Cory, M.J. Bailey, S. Higgs. *Bacillus thuringiensis*, na enviromental biopesticide: theory and practice. New York: John Wiley, p.311

Loguercio, L.L.; Santos, C.G.; Barreto, M.R.; Guimarães, C.T.; and Paiva, E. 2001. Association of PCR and feeding bioassays as a large-scale method to screen tropical *Bacillus thuringiensis* isolates for a cry constitution with higher insecticidal effect against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. Lett. Appl. Microbiol. 32:362-367.

Loguercio, L.L.; Carneiro, N.P.; Carneiro, A.A. 2002. Milho Bt - alternativa biotecnológica para controle biológico de insetos-praga. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento. 24:46-52.

Sambrook, J.; Fritsch, E.F. and Maniatis, T. 1998. Molecular Cloning: a Laboratory Manual 2nd. edn. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Valicente, H. F.; Barreto, M.R.; Vasconcelos, M.J.V. de; Figueiredo, J.E.F. de e Paiva e. 2000. Identificação através de PCR dos genes *cry* de cepas de *Bacillus thuringiensis* Berliner eficientes contra a lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J:E: Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). An. Soc. Entomol. Brasil. 29 (1):147-153.



XXV Congresso Nacional de Milho e Sorgo - 29/08 a 02/09 de 2004 - Cuiabá - Mato C