

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 56

Seleção de Estirpes de *Bacillus thuringiensis* Tóxicas a Traça-das-Crucíferas (*Plutella xylostella*)

Patrícia Teles Medeiros
José Manuel Cabral de Sousa Dias
Lilian Botelho Praça
Érica S. Martins
Márcio N. Ferreira
Rose Gomes Monnerat

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Serviço de Atendimento ao Cidadão

Parque Estação Biológica, Av. W5 Norte (Final) - Brasília, DF

CEP 70770-900 - Caixa Postal 02372

PABX: (61) 448-4600

Fax: (61) 340-3624

<http://www.cenargen.embrapa.br>

e.mail: sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: José Manuel Cabral de Sousa Dias

Secretária-Executiva: Maria José de Oliveira Duarte

Membros: Luciano Lourenço Nass

Regina Maria Dechechi G. Carneiro

Maurício Machaim Franco

Sueli Correa Marques de Mello

Vera Tavares Campos Carneiro

Suplentes: Maria Alice Bianchi

Maria Fátima Batista

Supervisor editorial: Maria José de Oliveira Duarte

Normalização Bibliográfica: Maria Alice Bianchi

Tratamento de ilustrações: Giscard Matos de Queiroz

Editoração eletrônica: Giscard Matos de Queiroz

1ª edição

1ª impressão (2003): tiragem 200 exemplares.

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Seleção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* tóxicas à traça-das-crucíferas (*Plutella xylostella*) / Patrícia Teles Medeiros ... [et al.]. — Brasília : Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003.

16p. — (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ISSN 1676 - 1340 ; n.56)

1. *Bacillus thuringiensis* – Avaliação – Toxidez. 2. Praga de planta – Brássicas – *Plutella xylostella*. 3. Controle microbiano - Inseto. I. Medeiros, Patrícia Teles. II. Série.

632.7- CDD 21

© Embrapa 2003

Seleção de Estirpes de *Bacillus thuringiensis* Tóxicas a Traça-das-Crucíferas (*Plutella xylostella*)

Patrícia Teles Medeiros¹

José Manuel Cabral de Sousa Dias²

Lilian Botelho Praça³

Érica S. Martins⁴

Márcio N. Ferreira⁵

Rose Gomes Monnerat⁶

Resumo

Plutella xylostella é a principal praga das Brássicas devido ao seu ciclo muito curto podendo ocorrer até mais de cinco gerações por ano e principalmente pelos sérios danos econômicos causados à cultura. Dentre os agentes de controle microbiano de grande importância destaca-se a bactéria *Bacillus thuringiensis*. Produtos a base desta bactéria representam cerca de 90% do mercado de bioinseticidas. O objetivo deste trabalho foi selecionar e caracterizar as estirpes de *B. thuringiensis*, pertencentes ao “Banco de germoplasma de *Bacillus* spp.,” mais tóxicas à *P. xylostella*. Observou-se que das 203 estirpes testadas, sete apresentaram alta toxicidade em relação ao padrão utilizado, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (HD-1) com mortalidade de 100%. Essas estirpes selecionadas apresentaram características semelhantes às dos padrões descritos para lepidópteros devido à composição de proteínas de 130 e 65 kDa e presença de genes *cry1* e *cry2*.

¹ Engenheira Agrônoma, mestranda, UFMT - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

² Eng. Químico Dr. - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

³ Bióloga, mestranda, UnB Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

⁴ Engenheira agrônoma, MSc, Assistente de Operações, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

⁵ Engenheiro Agrônomo Dr., - Universidade Federal de Mato Grosso

⁶ Bióloga, PhD, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Selection of strains of the *Bacillus thuringiensis* against the Diamondback Moth (*Plutella xylostella*)

Abstract

Plutella xylostella is the main pest of Brassicaceae due to its short cycle, which allows it to occur more than five generations a year and especially due to the serious economical damage caused on the culture. Among the microbial control agents the *Bacillus thuringiensis* bacteria stands out of others. Products based on this bacteria represent about 90% of the bioinsecticide market. The aim of this work was to select, characterize and field tests the most toxic *B. thuringiensis* strains from the germoplasm bank of *Bacillus* spp against *P. xylostella*. It was observed that seven out of the 203 strains tested showed high toxicity compared to the standard used, *B. thuringiensis* subsp. *Kurstaki* (HD-1) which showed 100% mortality. The selected strains showed features described for lepidoptera regarding the protein profile (130 and 65 kDa) and features obtained through the PCR reactions, being possible to identify the presence of the *cry1* and *cry2* genes.

Introdução

Dentre as várias pragas que atacam a cultura de brássicas, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae), conhecida como traça das crucíferas destaca-se como a de maior importância, e isso se deve aos sérios danos causados por esse inseto à cultura, depreciando o produto, podendo ocasionar perda total nos campos de produção.

Esses danos são causados devido à alimentação larval da traça que perfura e danifica as folhas reduzindo a área foliar e impedindo um bom desenvolvimento da planta (CASTELO BRANCO *et al.* 1999, FILGUEIRA 1987).

Segundo MONNERAT (1995), diversos inseticidas têm sido utilizados intensivamente durante o ciclo da cultura, e em algumas áreas já foram detectadas até 16 aplicações por cultivo. Além dos problemas gerados à saúde do agricultor e ao meio ambiente, o uso excessivo desses produtos, tem proporcionado o aparecimento de populações resistentes dessa praga a diversos compostos químicos, como é o caso de inseticidas piretróides e fosforados observado por CASTELO BRANCO & GATEHOUSE, (1997); VASQUEZ, (1995).

Diante dessa realidade o controle microbiano destaca-se como uma alternativa importante no controle de pragas da agricultura. Um agente entomopatogênico que tem sido muito estudado e utilizado é a bactéria *Bacillus thuringiensis*. Trata-se de uma bactéria de solo, podendo ser encontrada também em insetos mortos, na água e em algumas plantas. Produtos a base desta bactéria já são comercializados há mais de cinquenta anos

Esse bacilo produz um cristal protéico durante o processo de esporulação, que é composto por uma ou mais proteínas. Ao serem ingeridas essas proteínas se solubilizam em meio alcalino no intestino do inseto e são em seguida ativadas através da ação de proteases (HABIB & ANDRADE, 1998).

O uso dessa bactéria tem sido muito eficiente e cada vez mais empregado para o controle de diversas ordens de insetos principalmente para os lepidópteros.

Assim, neste trabalho, procedeu-se uma avaliação da toxicidade, seleção e caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* pertencentes ao Banco de

Germoplasma de *Bacillus*, da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia contra *P. xylostella*.

Material e Métodos

1. Criação Massal da traça: As larvas utilizadas nos bioensaios foram provenientes da criação massal da traça-das-crucíferas mantida em condições controladas de temperatura, umidade e fotoperíodo no laboratório de criação de insetos no prédio de Controle Biológico da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

2. Caracterização morfológica: As estirpes foram crescidas em Caldo Nutritivo em incubador rotativo por 48 horas a 200 rpm. Logo em seguida, foi realizada a observação e microscopia óptica em contraste de fases para a visualização de esporos, cristais e células vegetativas.

3. Bioensaio Seletivo: Foram avaliadas 203 estirpes pertencentes ao “Banco de *Bacillus* entomopatogênicos” da Embrapa – Recursos Genéticos e Biotecnologia. Folhas de plântulas de repolho foram imersas durante 10 minutos em uma solução com cada bacilo crescido em caldo nutritivo durante 48 horas diluído a 10%, foi adicionado também espalhante adesivo Extravon (30mL/100 L de água) (Fig. 1). Em seguida estas foram colocadas para secar verticalmente usando um suporte apropriado e em temperatura ambiente (Fig. 2). Após a secagem completa aproximadamente por uma hora, cada folha foi colocada em uma placa de Petri (Fig. 4) com dez lagartas de terceiro instar (Fig. 3), sendo duas repetições para cada estirpe, um controle negativo sem a adição do bacilo e uma estirpe padrão *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (HD-1).

Para a avaliação da mortalidade das larvas, foram realizadas duas leituras, uma no segundo dia com a troca da folha sem adição de bacilo e outra no quinto dia do bioensaio.

4. Caracterização Bioquímica e Molecular: As estirpes selecionadas através do bioensaio seletivo foram submetidas à caracterização bioquímica através de SDS-PAGE (Dodecil Sulfato de Sódio) e caracterização molecular por PCR (SILVA-WERNECK *et al.*, 2001) para constatar a presença e/ou homologia da proteína e do gene que codifica para proteínas eficazes contra lepidópteros.

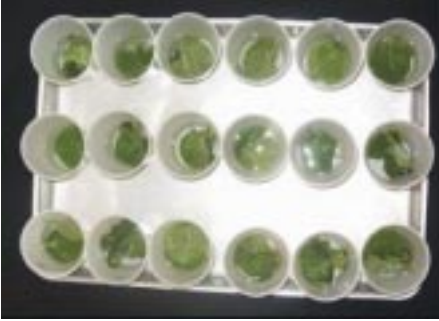


Fig.1. Imersão das folhas na solução



Fig.2. Secagem das folhas



Fig.3. Larva de terceiro instar



Fig.4. Placas de Petri com as folhas inoculadas

4.1 Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 10%)

4.1.1 Extração do complexo esporo-cristal: As estirpes bacterianas foram cultivadas em meio NYSM por 72 horas em incubador rotativo a 28 °C e 200 rpm e, em seguida, as proteínas foram extraídas de acordo com LECADET *et al.* (1991). Dessa cultura bacteriana foram transferidas 1.5 mL para tubos tipo Eppendorf de 2 mL, previamente autoclavado, e centrifugadas a 12.800 x g, em microcentrifuga Eppendorf, por 20 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e os sedimentos lavados com 1.5 mL de NaCl 0.5 M por 20 minutos. O NaCl 0.5M foi descartado e secaram-se as paredes do tubo eppendorf com papel de filtro. Os sedimentos foram lavados por duas vezes com 1,5 mL de PMSF a 1mM e centrifugados a 12.800 x g por 20 minutos. Descartou-se o PMSF 1mM e os sedimentos foram ressuspensos em 500ml de PMSF 1 mM e armazenados a -20°C.

4.1.2 Análise das proteínas Cry de *B.thuringiensis* em gel de Poliacrilamida-SDS

(SDS-PAGE): O complexo esporo-cristal das estirpes foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (dodecil sulfato de sódio) a 10% (SDS-PAGE), conforme procedimento descrito por LAEMMLI (1970) e SCHAGGER E VON JAGOW (1987). Alíquotas de 20µl das preparações de esporos-cristais foram diluídas em tampão de amostra de proteína 5X (1.5M Tris-HCl, pH 6,8, Glicerol, SDS, 2b-Mercaptoetanol, Azul de Bromofenol) fervidas a 100 °C por 5 minutos e aplicadas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE. Foram utilizados 8µl de marcador de proteína de alto e baixo peso molecular (Range Rainbow). A eletroforese foi realizada em aparelho Hoefer miniVE vertical eletroforesis system – Amersham Pharmacia, contendo tampão de corrida 1X (Tris-base, glicina, SDS 10%), em voltagem constante de 150V, por aproximadamente 1 hora e 30 minutos. Percorrido este tempo o gel foi corado em solução de corante Comassie blue (40% metanol, 25% de Comassie blue 250-R) por uma hora e descorado com solução contendo 40% de metanol e 10% de ácido acético em torno de duas horas até a visualização dos perfis protéicos das estirpes de *Bacillus thuringiensis*.

4.2 Identificação de genes cry por meio de PCR (Reação em cadeia de polimerase)

4.2.1 Extração do DNA das estirpes: A extração do DNA total das estirpes selecionadas foi realizada de acordo com a metodologia descrita por BRAVO *et al.* (1998). As estirpes foram cultivadas em meio Ágar nutritivo mantidas a 30 °C durante 16 horas. Em tubos tipo Eppendorf foi adicionado 100 ml de Água MilliQ estéril e uma alçada do cultivo com a bactéria, em seguida a amostra foi homogeneizada em aparelho Vortex e mantida no freezer em temperatura -20 °C por uma hora e logo após fervida por 10 minutos para lisar as células. Findado esse período o material foi centrifugado a 12.800 x g por 30 segundos, em microcentrífuga Eppendorf. O sobrenadante foi transferido para um outro eppendorf e preparou-se então a PCR. Na preparação do mix da PCR foi utilizado 245 µl de água estéril, 50µl tampão de PCR 10x, 20 µl de cada primer, 5 µl de Taq DNA polimerase e 10 µl de dNTP total para 10 reações. Para a realização da PCRs 15 µl do sobrenadante (de cada estirpe) foi transferido para um novo tubo e adicionada 35 µl do Mix preparado anteriormente. Para a identificação de genes *cry1* nos isolados foram usados os pares de “primers” gerais *gral-cry1* (BRAVO *et al.*, 1998), *gral-cry2* para a identificação de genes

cry2 e *gral-cry9* para identificação do gene *cry9*. A amplificação foi processada em termociclador de DNA e as condições das PCRs foram as seguintes: 94°C por um minuto de desnaturação, 52°C por um minuto de anelamento, 72°C por um minuto de extensão e uma extensão extra de 72°C por cinco minutos num total de 30 ciclos. A amplificação foi processada em termociclador e as condições das PCRs com estes outros “primers” foram similares, exceto para *gral-cry-9* onde a temperatura de anelamento foi de 51°C.

Uma alíquota de 24 µL de cada produto de PCR foi misturada com tampão de amostra 6X e aplicada em gel de agarose 2%. A corrida eletroforética foi processada em Tampão TBE 1X (Tris-base, Ácido bórico, EDTA 0,5M – pH 8,0). Após a corrida, o gel foi corado com brometo de etídio diluído em água na concentração de 1mg/ml por 20 minutos, e descorado em água destilada por 15 minutos.

O gel foi observado em transluminador sob luz UV e fotografado em foto-documentador modelo Eagle Eye (Stratagene).

Resultados e Discussão

Tendo em vista que *P.xylostella* é bastante susceptível a *B.thuringiensis* foram selecionadas apenas aquelas estirpes que apresentaram mortalidade de 100% para o procedimento de caracterização bioquímica e molecular das mesmas.

Sete das 203 estirpes avaliadas, apresentaram alta toxicidade para a traça em relação ao padrão utilizado, *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (HD-1), com mortalidade de 100% conforme demonstrado na Tabela 1.

Na determinação do peso molecular das proteínas totais, foi observado que as proteínas encontradas nas estirpes tóxicas apresentaram tamanho compatível com as toxinas já descritas efetivas para lepidópteros de 130, 65 kDa (Figura 5). Resultados estes que corroboram com os já descritos por MONNERAT & BRAVO, 2000; HERRERO, 2002) confirmando a ação destas proteínas para a traça-das-crucíferas.

Tabela 1 . Procedência, perfil protéico e comparação gênica das estirpes de *Bacillus thuringiensis* que causaram 100% de mortalidade em larvas de *P.xylosttella*.

<i>Estirpe</i>	<i>Procedência</i>	<i>Perfil Proteico (kDa)</i>	<i>Genes</i>
HD-1	RS	130 e 65	<i>cry1, cry2</i>
S390	PA	45 e 65	<i>cry2</i>
S764	SC	130,65	<i>cry1, cry2</i>
811	SC	130,65	<i>cry1, cry2</i>
S845	BA	130	<i>cry1, cry2</i>
S1265	SP	130,65	<i>cry1, cry2</i>
S1269	SP	130, 65	<i>cry1, cry2</i>
S1905		130,65	<i>cry1, cry2</i>

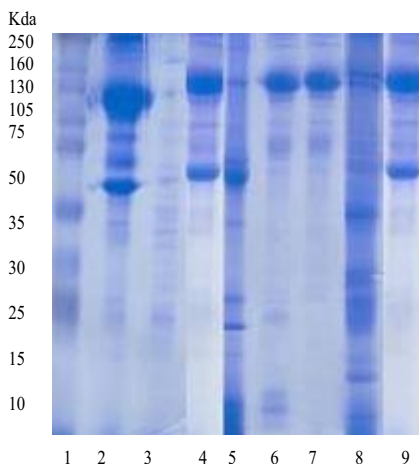


Fig.5. SDS-PAGE 10% do complexo esporo-cristal das estirpes de *B. thuringiensis* 1: Marcador Full Range Rainbow Protein molecular weight; 2:HD-1, 3:S390, 4:S764, 5:S811, 6:S845, 7:S1265, 8:S1269, 9:S1905.

A análise molecular com utilização dos primers *cry1* geral gerou produtos de PCR com fragmento de tamanho esperado para todas as estirpes com exceção da estirpe S390 (Figura 6), indicando a presença dos genes *cry1*.

O produto obtido da PCR onde utilizou-se o primer geral para *cry2* confirmou a presença do gene, através do fragmento de 526 pb confirmando ainda sua presença no padrão HD-1 (Figura 7). De acordo com o trabalho de CARDENÁS *et al.*, 2001 a presença desse gene nos isolados é importante, pois ele codifica proteínas tóxicas para lepidópteros e dípteros conforme já observado também por MONNERAT *et al.* (1999).

A PCR com os primers para a identificação de genes *cry9* não produziu fragmentos de tamanho esperado indicando que as estirpes não possuem esse gene. A não identificação do gene *cry9* nas estirpes avaliadas concorda com os resultados de BRAVO *et al.*, (1998) que cita a pouca frequência da presença desse gene nas estirpes apenas 2,50%, porém difere dos resultados obtidos por PINTO & FIÚZA, (2003) em que os autores verificaram a distribuição de genes *cry* de estirpes isoladas de solos do Estado do Rio Grande do Sul obtendo uma alta frequência de genes *cry9* de 47,82%. Os autores sugerem que essas diferenças podem estar associadas a fatores abióticos, como características físico-químicas do solo dentre outros fatores que foram avaliados na pesquisa.

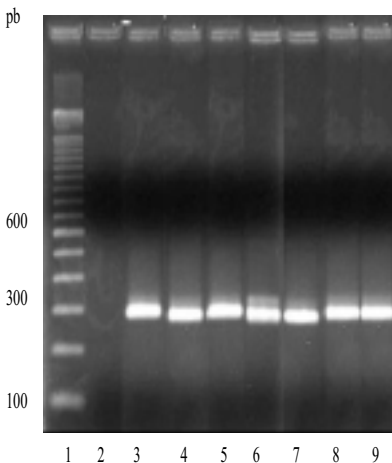


Fig.6. Produtos de PCR obtidos com “primers” específicos para genes tipo *cry1*, através da utilização dos “primers” *cry1* geral e DNA das estirpes 1: Marcador de massa molecular, 100bp DNA Ladder (Pharmacia), 2:Controle, 3:HD-1, 4:S764, 5:S811, 6:S845, 7:S1265, 8:S1269, 9:1905.

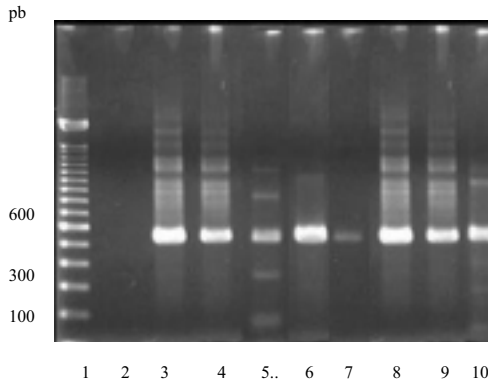


Fig.7. Produtos de PCR obtidos com “primers” específicos para genes tipo *cry2*, através da utilização dos “primers” Cry2(d)/Cry2(r) e DNA das estirpes 1-Marcador de massa molecular, 100bp DNA Ladder (Pharmacia), 2-Controle negativo, 3:HD-1, 4:S390, 5:S764, 6:S811, 7:S845, 8:S1265, 9:S1269, 10:1905.

Conclusão

Através das técnicas utilizadas de caracterização de *Bacillus thuringiensis*, foi possível constatar o potencial inseticida das estirpes selecionadas à *P.xylostella*. Estas bactérias poderão, ser utilizadas futuramente em programas biotecnológicos, para a produção de bioinseticidas, e devido a presença de genes diferentes poderão ser incluídas em estudos relacionados ao manejo de resistência da praga a inseticidas ou mesmo na produção de plantas geneticamente modificadas.

Referencias Bibliográficas

BRAVO, A., et al. Characterization of *cry* Genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* Strain Collection. Appl. **Environ. Microbiol.** V.64, n. 12, p. 4965-4972, 1998.

CÁRDENAS, M. I. *et al.* Selección de toxinas Cry contra *Trichoplusia ni*. **Ciencia Uani** v. IV, n. 1 p. 51-62, Valência, enero/marzo, 2001.

CASTELO BRANCO, M.; GATEHOUSE, A.G. Insecticide resistance in *Plutella xylostella* (L.) (Lepidóptera: Yponomeutidae) in the Federal District, Brazil. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 26, n.1 p. 75-79, 1997.

CASTELO BRANCO, M. Avaliação da eficiência de formulações de *Bacillus thuringiensis* para o controle de traça-das-crucíferas em repolho no Distrito Federal. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 17, n. 3, p. 237-240, novembro 1999.

FILGUEIRA, F.A.R. **ABC da olericultura: guia da pequena lavoura**. São Paulo: Agronômica Ceres. 1987.

HABIB M.E.M & ANDRADE C.F.S. Bactérias Entomopatogênicas. In: **Controle Microbiano de Insetos** ed. por Sérgio Batista Alves. 2 ed. Piracicaba: FEALQ, 1998 1163p.

HERRERO, S. S. Los receptores de las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis* y sus implicaciones en el desarrollo de resistencia. **Tesis Doctoral Universitat Universidad de Valencia** Enero 2002.

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

LECADET, M.M.; CHAUFaux, J.; RIBIER, J.E.; LERECLUS, D. Construction of novel *Bacillus thuringiensis* strains with different insecticidal activities by transduction and transformation. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 58, p. 840-849, 1991 .

MONNERAT, R. G... Interrelations entre la teigne des cruciferes, *Plutella xylostella*, son parasitoide *Diadegma* sp. et la bacterie entomopathogene *Bacillus thuringiensis* Berliner. **These de doctorat en Sciences Agronomiques**. Ecole Nationale Superieure Agronomique de Montpellier, 160 p. 1995

MONNERAT R.S *et al.* Differential Activity and Activation of *Bacillus thuringiensis* Insecticidal proteins in Diamondback Moth, *Plutella xylostella*. **Current Microbiology**, New York. v 39, n 3 p. 159-162, 1999.

MONNERAT R.S.P; BRAVO A. Proteínas Bioinseticidas produzidas pela Bactéria *Bacillus thuringiensis*: Modo de ação e Resistência. . In: **Controle Biológico**, eds. Melo, I.S. e Azevedo, J.L., Jaguariúna, SP, Embrapa Meio Ambiente, Vol.3, p.163-200, 2000.

PINTO L. M. N. & FIUZA L. M. Distribuição de genes cry de *Bacillus thuringiensis* isolados de solos do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural** v. 33 n. 33 Santa Maria Jul/Ago. 2003.

SCHAGGER, H., G. VON JAGOW. Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Analytical Biochemistry**, 166: 368-379 1987.

SILVA-WERNECK, J.O.; MONNERAT, R. **Metodologias para caracterização de isolados de *Bacillus thuringiensis***. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. 5 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Circular técnica, 10).

VASQUEZ , B.L. University of Florida of Insect Records Chapter 15 Resistant to Most Insecticides: **Department of Entomology & Nematology**. University of Flórida, Gainesville, Flórida 32611-0620 1995 capturado em 19/09/2002 site www.google.com.br disponível em <http://ufbir.ifas.ufl.edu/chap15.htm>