

Caracterização de isolados de *Bacillus thuringiensis* ativos contra *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)

Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates active against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)

Lucília Macedo Mandú TREMILIOSI¹, Marta de Campos NEVES¹, Viviane Cristina VIEIRA¹, Vivian Boter BERGAMASCO¹, Ricardo Antônio POLANCZYK², Manoel Victor Franco LEMOS¹.

¹ Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária da FCAV/UNESP, Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane s/n, 14884-900, Jaboticabal - SP, Brasil. *Autor para correspondência: mvictor@fcav.unesp.br

² Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo.

Resumo

Bacillus thuringiensis é uma bactéria entomopatogênica que, durante a esporulação, produz proteínas cristal, codificadas pelos genes *cry*, podendo atingir pragas de diversas ordens. Esta bactéria é utilizada no controle de pragas como *Spodoptera frugiperda*, causadora de sérios prejuízos na agricultura. O objetivo desta pesquisa foi caracterizar isolado de *B. thuringiensis* por meio de técnicas moleculares, microbiológicas e bioensaios de patogenicidade, visando ao controle biológico de *S. frugiperda*. Foram realizadas amplificações por PCR, análise de perfil plasmidial e antibiogramas para a identificação e análise da diversidade genética das subclasses do gene *cry1A* (Aa, Ab, Ac e Ae); além disso, foi determinada a eficiência dos isolados por bioensaios. As técnicas moleculares determinaram alta similaridade genética entre os isolados estudados, e os antibiogramas realizados mostraram que todos os isolados foram sensíveis aos antibióticos estreptomicina, canamicina, rifampicina e eritromicina, para diferentes CMIs. Os bioensaios demonstraram o potencial patogênico dos isolados e linhagens no controle de lagartas de primeiro instar de *S. frugiperda*.

Palavras-chave adicionais: RAPD; perfil plasmidial; antibióticos; genes *cry*.

Abstract

Bacillus thuringiensis is an entomopathogenic bacterium that, during sporulation, produces crystal proteins, coded by *cry* genes, which can act on crop pests such as *Spodoptera frugiperda*, abolishing its destructive effect. The objective of this work was to characterize some *B. thuringiensis* isolates by means of molecular and microbiological techniques and confirm their action by development of bioassays, seeking the biological control of *S. frugiperda* larvae. Amplicons's size, plasmid profiles and antibiograms analyses were performed for identification and determination of the degree of genetic diversity using the subclasses of the gene *cry1A* (Aa, Ab, Ac e Ae). The molecular techniques suggest high genetic similarity among the studied isolates and the antibiograms performed show that all the isolates were sensitive to the antibiotics streptomycin, kanamycin, rifampicin, and erythromycin, exhibiting different MICs. The bioassays demonstrated the entomopathogenic potential of the isolates and control strains controlling first instar *S. frugiperda* larvae.

Additional keywords: RAPD, plasmid profiles, antibiotics, *cry* genes.

Introdução

Bacillus thuringiensis é uma bactéria de solo que, durante a esporulação, produz inclusões cristalinas (proteínas cristal) que são responsáveis pela atividade entomopatogênica pela qual a espécie é conhecida. As proteínas cristal ou δ -endotoxinas são codificadas pelos genes *cry*, podendo atingir insetos-praga pertencentes às Ordens Lepidoptera, Díptera e Coleoptera (GLARE & O' CALLAGHAM, 2000). Os genes

cry encontram-se localizados no cromossomo e principalmente em plasmídios, sendo que algumas linhagens apresentam esses genes somente em plasmídios. O gene *cry1Ac*, por exemplo, está localizado em um único plasmídio de 50 MDa na linhagem *kurstaki* HD73 (LERECLUS et al., 1993), enquanto outras linhagens, como a subespécie *aizawai* 7.29, contém cinco genes, estando quatro deles localizados no cromossomo ou em um megaplasmídio, e um quinto, num plasmídio de 45 MDa (SANCHIS et al., 1998).

A patogenicidade e a especificidade de uma linhagem são determinadas pelos tipos de genes *cry* funcionais que a mesma possui, aliado ao fato de esses evidenciarem alto grau de variabilidade genética para esta espécie.

A caracterização dos genes *cry* é geralmente a forma escolhida para a realização de buscas por novos isolados. A técnica de PCR (MULLIS & FALOONA, 1987) tem-se tornado essencial na caracterização de isolados a partir de regiões conhecidas do gene *cry*, além de comparar isolados pouco conhecidos e indicar a especificidade de cada gene para várias ordens de insetos-praga (CAROZZI et al., 1991; BRAVO et al., 1998; PORCAR & JUAREZ-PEREZ, 2003). A tecnologia de RAPD (DNA polimórfico amplificado ao acaso), por exemplo, é muito utilizada na obtenção de informações para análises filogenéticas (WILLIAMS et al., 1990). O estudo de perfis plasmidiais de isolados de *B. thuringiensis* também tem demonstrado informações importantes na caracterização de isolados de bactérias.

Contudo, além dos genes *cry*, *B. thuringiensis* apresenta genes que conferem resistência a diversos antimicrobianos, que vêm sendo utilizados em trabalhos de caracterização e isolamento desta bactéria (SÁNCHEZ & PENA, 2000). Alguns estudos utilizam antimicrobianos associados a outras técnicas, como a PCR, para caracterizar e identificar novos isolados de *B. thuringiensis* e *Bacillus sphaericus* (CAVALEIRO et al., 2005).

No Brasil, *B. thuringiensis* vem sendo utilizado como bioinseticida no controle de muitas pragas, principalmente da *Spodoptera frugiperda*, lagarta que atinge diversas culturas, principalmente a do milho. A maioria dos produtos de *B. thuringiensis* usada para controlar lepidópteros-praga é baseada na mistura esporos-cristais, produzida pela estirpe HD-1 de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, a qual tem amplo espectro de atividade larvicida dentro da Ordem Lepidoptera (NAVON, 1993). Entretanto, insetos pertencentes à Família Noctuidae, na qual se incluíam as diversas espécies de *Spodoptera*, são pouco sensíveis a esses produtos (MOAR et al., 1990; INAGAKI et al., 1992; NAVON, 1993; LAMBERT et al., 1996). Além disso, existem relatos de evolução e resistência desta praga aos inseticidas químicos, mostrando que este controle apresenta sérias limitações práticas (YU, 1992; DIEZ-RODRIGUES & OMOTO, 2001). Estudos que buscam a seleção de isolados eficientes a *S. frugiperda* têm relatado altos índices de mortalidade em isolados que apresentaram, por meio da técnica de PCR, as classes e subclasses do gene *cry1*, sendo também importantes para outros insetos da Ordem Lepidoptera (PRAÇA et al., 2004; CAVALEIRO et al., 2005).

Este trabalho teve por finalidade caracterizar isolados de *B. thuringiensis* por meio de técnicas moleculares, microbiológicas e bioensaios de patogenicidade visando ao controle biológico de *S. frugiperda*.

Material e Métodos

Linhagens e isolados de *B. thuringiensis*

Os isolados MT6, MT7, SP8, SP6, PR2 e a linhagem HD73 foram selecionados para este trabalho por apresentarem o gene *cry1A*, arranjo plasmidial e uma possível ação patogênica contra insetos da ordem Lepidoptera. Já a linhagem *B. thuringiensis* CRY(-)B foi selecionada por ser acristalífera (STAHLY et al., 1978), podendo tornar-se um controle-padrão para as técnicas utilizadas nesta pesquisa. As linhagens de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD73 (BSC – 4D4) e subsp. CRY(-)B (BSC – 4D11) foram cedidas pelo “Bacillus Stock Center” (BSC), Ohio State University – EUA, e os isolados MT6, MT7, SP8, SP6 e PR2 foram provenientes da coleção de isolados de *B. thuringiensis* mantida no Laboratório de Genética de bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA). Para a técnica de RAPD e bioensaio, foi utilizado como controle positivo o *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 e, para as ampliações por PCR, foi utilizado o isolado BR6 por apresentar o gene *cry1Ab* da coleção do LGBBA, identificado por VILLAS-BÔAS & LEMOS (2004).

Cultivo de *Bacillus thuringiensis*

As bactérias foram semeadas em meio de cultura BHI sólido (Brain Heart Infusion Ágar) e incubadas a 30 °C por 12 h. Uma pequena quantidade de células foi depositada em erlenmeyers contendo 50 ml de meio de cultura BHI líquido, incubados a 30 °C, por 4 h e 30 min sob agitação. Após este processo, a suspensão foi centrifugada a 2.450 x g, a 10 °C por 15 min.

PCR com iniciadores específicos de genes *cry*

Após a obtenção das células bacterianas, foi extraído o DNA genômico conforme o protocolo de MARMUR (1961). Essas amostras de DNA extraídas foram utilizadas nas análises moleculares por PCR.

A Tabela 1 apresenta os oligonucleotídeos iniciadores que foram elaborados a partir das regiões conservadas e não conservadas das sequências correspondentes a cada uma das subclasses do gene *cry1* para a Ordem Lepidoptera, obedecendo à lista de nomenclaturas das delta-endotoxinas de *B. thuringiensis* disponível no site http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/toxins2.html. Para o alinhamento de

todas as sequências de cada subclasse, utilizou-se o “software” Clustal W (THOMPSON et al., 1994) e o “software” Gene Runner 3.0 (Hastings

Software, Inc.). Como controle positivo, foi usado o isolado BR6 para todos os primers testados.

Tabela 1 - Seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores específicos na determinação das regiões conservada e não conservada das subclasses do gene *cry1*.

Table 1 - Sequence of specific oligonucleotides initiators in the determination of the conserved and non conserved subclasses of gene *cry1*

<i>cry1Aa</i> conservada (426 pb)	F 5` TATTCCTTGTGCGCTAACGC 3` R 5` CCAAACACTGAAACATCTCTC 3`
<i>cry1Aa</i> não conservada (1035 pb)	F 5` TTCGCATCATTTCTCCTTAG 3` R 5` CTGTCCACGATAAATGTTCC 3`
<i>cry1Ab</i> conservada (799 pb)	F 5` GAGATGTTTCAGTGTTTGGAC 3` R 5` GTCCCGTCAAGAACAGATAG 3`
<i>cry1Ab</i> não conservada (640 pb)	F 5` CGGGTAATCGCTCGTCTATC 3` R 5` CTTACTTCTCGCCATTATCC 3`
<i>cry1Ac</i> conservada (712 pb)	F 5` GGTGCTGGATTTGTGTTAGG 3` R 5` TTCTTTCTATGCCCTGAGCC 3`
<i>cry1Ac</i> não conservada (656 pb)	F 5` AACATTGGAGTGGAAAGAAC 3` R 5` TTACTIONCTCGCCATTATCC 3`
<i>cry1Ae</i> conservada (838 pb)	F 5` GCTCTTACAACCGCTATTCC 3` R 5` TATTATCCTGTGGTGGTATTTTC 3`

As reações de amplificação foram realizadas em um volume de reação de 20 µl contendo: DNA (40 ng), dNTPs (10 mM); MgCl₂ (1,75 mM); iniciadores (0,3 pmol de cada); enzima *Taq* DNA polimerase (1,5 U); tampão para PCR 10X (200 mM Tris-HCl (pH 8,4), 500 mM KCl) e água destilada grau “Milli-Q” estéril (q.s.p.). As amplificações ocorreram utilizando um termociclador (PTC-100TM, MJ Research, Inc.) onde foi estabelecido o seguinte programa: 5 min a 95 °C, seguido de 31 ciclos de 1 min a 95 °C, 1 min a 50 °C, 1 min a 72 °C, finalizando a 72 °C por 5 min.

Os fragmentos amplificados foram analisados em gel de agarose a 1,5%, visualizados sob luz UV em um fotodocumentador (Gel Doc 2000 Bio-Rad) e comparados ao padrão de tamanho molecular “1 kb Plus DNA Ladder”.

PCR com iniciadores inespecíficos (RAPD)

As reações de RAPD foram realizadas segundo WILLIAMS et al. (1990). Para os ensaios de amplificação, foram utilizadas amostras de DNA dos isolados e das linhagens, empregando-se um conjunto de 15 oligonucleotídeos iniciadores de sequências arbitrárias de 10 bases, provenientes da coleção “University of British Columbia – Nucleic Acid – Protein Service Unit” (Canadá). Como controle positivo, foi utilizada a

linhagem HD-1, e como controle diferencial, uma amostra de DNA de planta.

As reações foram realizadas em um volume de 20 µl contendo: DNA (20 ng), dNTP (10 mM), MgCl₂ (1,75 mM), iniciador (5 ng), enzima *Taq* DNA polimerase (2 U), tampão para PCR 10X (200 mM Tris-HCl (pH 8,4), 500 mM KCl) e água destilada grau “Milli-Q” estéril (q.s.p.). As reações foram submetidas às seguintes condições: 2 min a 94 °C, seguido de 34 ciclos de 1 min a 94 °C, 2 min a 36 °C, 2 min a 72 °C e 5 min a 72 °C para completa amplificação. Os fragmentos amplificados foram analisados como descrito no item anterior.

Por meio da análise do bandejamento produzido com o uso de cada oligonucleotídeo iniciador aleatório, foi conferido o parâmetro 1 para a presença de banda e 0 para a ausência de banda, permitindo a elaboração de uma matriz binária. Essa matriz foi utilizada para a construção de um dendrograma pelo “software” FreeTree Win 95/98/NT (HAMPL et al., 2001). A similaridade genética entre os isolados foi estimada pelo coeficiente de distância descrito por NEI (1986). Para o agrupamento dos dados da matriz filogenética, foi utilizado o método da média das distâncias genéticas (UPGMA- Unweighted Pair Group Method for Arithmetic Averages) (SNEATH & SOKAL, 1973), sendo que o

dendrograma foi obtido com o auxílio do "software" TreeView (PAGE, 1996).

Separação do material genético por ultracentrifugação

A separação do DNA cromossômico e plasmidial foi realizada de acordo com SAMBROOK & RUSSEL (2001).

Determinação dos perfis plasmidiais dos isolados de *B. thuringiensis*

Para verificar a integridade e a concentração dos plasmídios de cada isolado, utilizaram-se 10 µL de cada amostra, adicionado de 3 µL de tampão de amostra e aplicada em gel de agarose "Low Melting Point" (GIBCO) de concentração 0,7 %, diluído em tampão TAE 1X (Tris-Acetato-EDTA), sendo submetido a uma corrente elétrica de 24 V por 12 h.

Reação de restrição dos DNAs plasmidiais

A reação de restrição efetuada nos plasmídios foi conduzida em um volume total de 12 µL, contendo: enzima de restrição *EcoRI* 10 U/µL (0,3 µL), tampão para a enzima *EcoRI* 10X concentrado (1 µL), água destilada grau "Milli-Q" (7,7 µL) e 3 µL de DNA (210 ng/µL).

Determinação da resistência e suscetibilidade de *B. thuringiensis* frente a antibióticos

A determinação das CMI's foi realizada pelo método de diluição seriada, aplicando-se concentrações crescentes do antibiótico aos meios de cultura BHI sólido, determinando-se a menor concentração capaz de inibir o crescimento das bactérias, baseado no método descrito por LIGHTFOOT et al., 1989.

Os antibióticos utilizados foram: estreptomicina, rifampicina, canamicina e eritromicina, todos mantidos em concentração-estoque de 100 mg/mL. Os antibióticos foram utilizados nas concentrações de 40, 60, 80, 100 e 120 µg/mL. As células foram quantificadas em espectrofotômetro DU 640B (Beckman) para a verificação dos valores de D.O. a 600 nm entre valores 0,5 e 0,8 e posteriormente incubadas por 24 h.

Bioensaios contra *Spodoptera frugiperda*

Os isolados e as linhagens de *B. thuringiensis* foram cultivados em meio de cultura NA e incubados por três a cinco dias a 30 °C para esporulação. A suspensão de esporos-cristais de cada placa foi recolhida, analisada por microscopia óptica e transferida para tubos Falcon contendo 20 ml de água destilada estéril. Para a retirada do sobrenadante, os tubos foram centrifugados a 1.301 x g por 30 min e adicionados 20 ml de água, sendo esta operação repetida por três vezes. Posteriormente, foram adicionados

10 mL de água destilada em cada tubo para armazenamento.

A concentração da suspensão de esporos-cristais foi estabelecida por meio da padronização de 3×10^8 (BATISTA et al., 2005) e as lagartas foram alimentadas com dieta artificial semissólida (BARRETO et al., 1999).

Para as análises estatísticas dos bioensaios, os dados percentuais de mortalidade foram submetidos à análise de variância, cujo modelo matemático proposto incluiu o efeito fixo de linhagens. Os testes de comparação de médias entre as linhagens foram aplicados após a verificação do efeito do grupo sobre a porcentagem de mortalidade, comparando-se as médias pelo teste de Tukey a 5 %. Para estabelecer a diferença mínima significativa entre as médias de mortalidade dos isolados, utilizou-se o Sistema de Análise Estatística - SANEST (ZONTA & MACHADO, 1984).

Resultados e Discussão

Os iniciadores elaborados para a amplificação da região conservada do gene *cry1A* (*cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac* e *cry1Ae*) determinaram que estas subclasses apresentaram homologia. Diante deste fato, as proteínas traduzidas a partir destas sequências podem ser diferentes ou não, podendo ocorrer uma relação de sinergismo entre elas mediante seu modo de ação dentro do inseto (FERRÉ & VAN RIE, 2002).

Para as subclasses do gene *cry1A*, os iniciadores utilizados nas PCRs dos isolados HD73, MT6, MT7, SP8 e SP6 permitiram a amplificação de todas as subclasses do gene *cry1A* de ambas as regiões. A linhagem HD73, tal como descrito por LERECLUS et al. (1993), apresentou a subclasse do gene *cry1Ac*, demonstrando este gene em um único plasmídio de 50 MDa. Após as amplificações, foram constatadas outras subclasses presentes nesta linhagem, pois os iniciadores elaborados podem ter amplificado mais de uma subclasse, por estarem em uma região de homologia entre elas.

O isolado PR2 não apresentou fragmentos para o gene *cry1Ae* da região conservada nem para o *cry1Ac* da região não conservada, porém amplificou para as demais regiões, confirmando a presença do gene *cry1A* (Figura 1).

A linhagem CRY(-)B não amplificou para nenhuma das subclasses do gene *cry1A*, sendo este resultado já esperado, visto que STAHLY et al. (1978) realizaram a identificação desta linhagem de *B. thuringiensis* por detecção do antígeno flagelar e descreveram-na como acristalífera.

A análise dos fragmentos produzidos, que envolvem as subclasses do gene *cry1A*, tendo como molde o material genético obtido dos isolados MT6, MT7, SP6, SP8, PR2 e a linhagem HD73, permitiu caracterizá-los quanto à presença das subclasses do gene *cry1A*, relatando por meio das mesmas a presença deste gene. Os produtos de amplificação, provenientes dos

iniciadores elaborados para as subclasses do gene *cry1A* nos isolados MT6, MT7, PR2, SP6 e SP8, diferiram-se dos resultados encontrados por VILAS-BÔAS & LEMOS (2004). Estes autores não observaram ampliações de bandas para as mesmas subclasses deste gene, pois utilizaram iniciadores obtidos de diferentes regiões do mesmo gene.

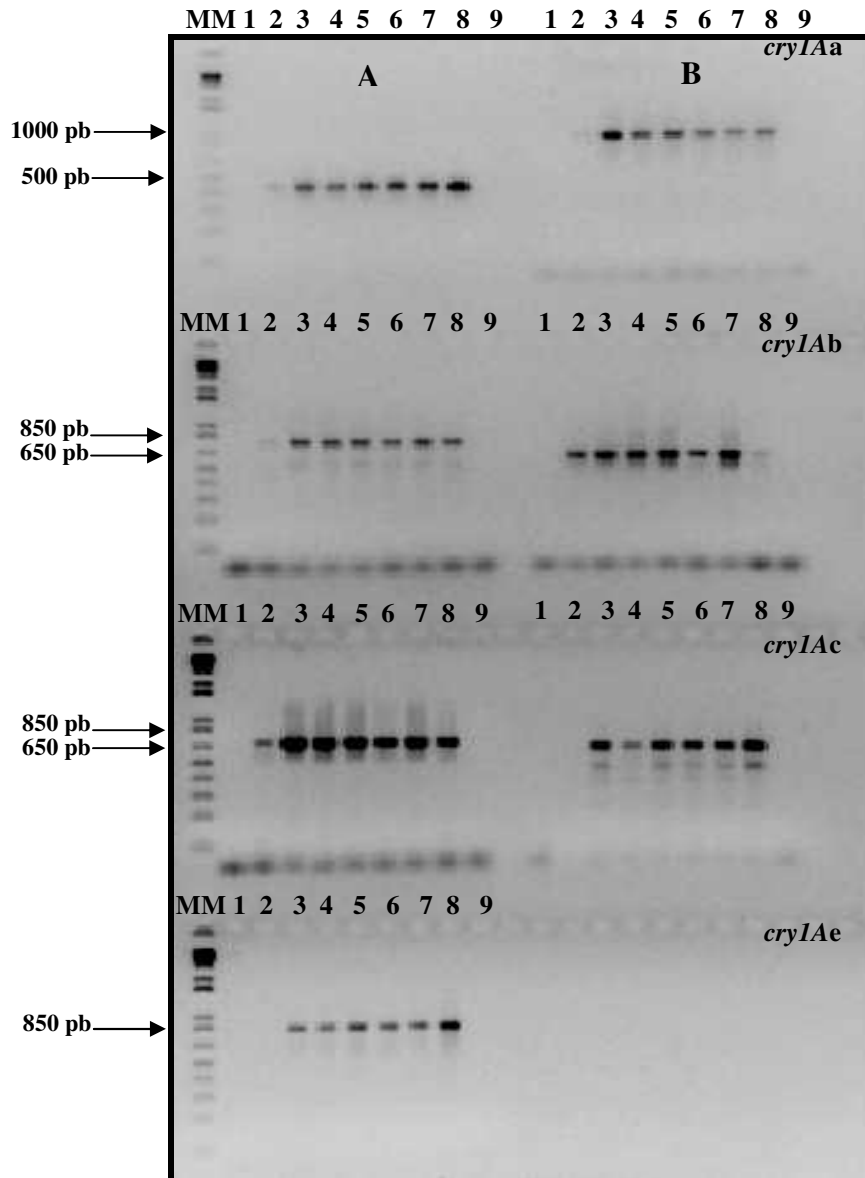


Figura 1 - Amplificação das regiões conservadas (A) e não conservadas (B) dos genes *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac* e *cry1Ae* dos isolados de *B. thuringiensis*, sendo: MM-marcador de tamanho molecular "1 kb Plus DNA Ladder®"; 1-CRY(-)B; 2-PR2; 3-HD73; 4- MT7; 5-SP6; 6-SP8; 7-MT6; 8-BR6; 9-controle negativo.

Figure 1 - Amplification of regions A (conserved) and B (non conserved) of genes *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, and *cry1Ae* of the *B. thuringiensis* isolates where MM – marker of molecular size "1 kb Plus DNA Ladder®"; 1-CRY(-)B; 2 – PR2; 3 – HD73; 4 – MT7; 5 – SP6; 6 – SP8; 7 MT6; 8 – BR6; 9 – negative control.

A separação do material genético por DNA plasmidial em todos os isolados e na ultracentrifugação possibilitou a detecção do linhagem HD73, com exceção da linhagem

CRY(-)B. A restrição feita com a enzima *EcoRI* demonstrou que os plasmídios dos isolados MT6, MT7, SP8 e SP6 apresentaram sítios de restrição semelhantes, e a linhagem HD73 e o isolado PR2 apresentaram sítios que diferiram entre si e dos demais. A restrição efetuada com

material genético oriundo dos cromossomos permitiu a visualização de um “smear”. A restrição confirmou a ausência de contaminação do DNA plasmidial com DNA cromossômico (Figura 2).

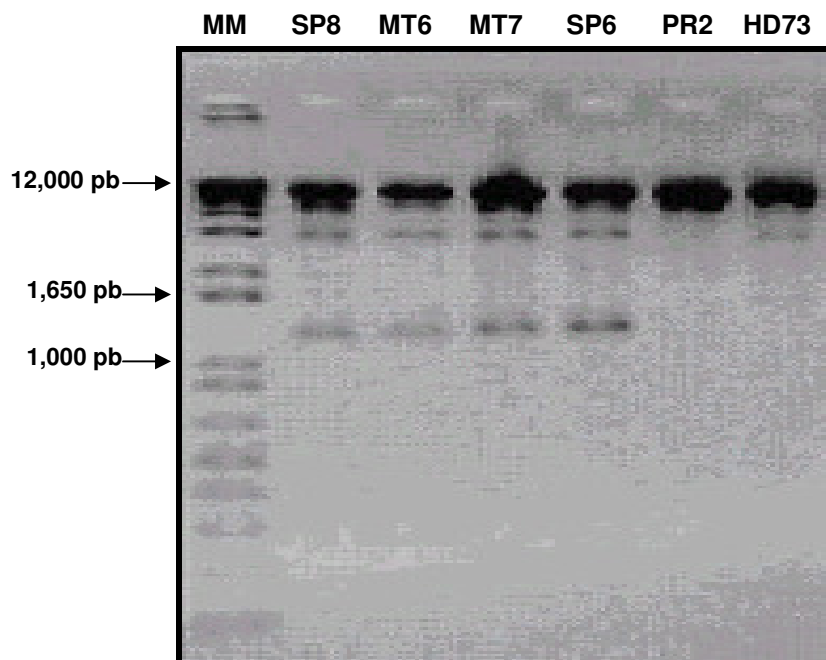


Figura 2 - Restrição dos plasmídios dos isolados de *B. thuringiensis* com a enzima *EcoRI*. MM-marcador de tamanho molecular 1 kb Plus DNA Ladder.
 Figure 2 - Plasmid restriction of the *B. thuringiensis* restriction with the enzyme *EcoRI*. MM – marker of molecular size 1 kb Plus DNA Ladder

A análise dos perfis plasmidiais dos sete isolados apresentou dois perfis diferentes, sendo que os isolados MT6, MT7, SP8 e SP6 evidenciaram o mesmo perfil, e a linhagem HD73 e o isolado PR2 foram semelhantes. A linhagem CRY(-)B foi utilizada para demonstrar a ausência de perfil (Figura 3). VILAS-BÔAS & LEMOS (2004) consideram este tipo de estudo importante para diferenciar os isolados e caracterizá-los. Estes autores consideram que o aparecimento ou a ausência de bandas pode ser em decorrência da presença de diferentes configurações de um mesmo plasmídio, ou a não recuperação de alguns plasmídios durante a fase de extração do DNA. No entanto, estas perdas também podem ocorrer durante a separação pela ultracentrifugação e durante o processo de retirada de brometo e cloreto de céσιο das amostras.

No estudo das CMIs, a linhagem CRY(-)B foi resistente ao antibiótico rifampicina em todas as concentrações, diferenciando-se dos demais, que foram totalmente suscetíveis para este antimicrobiano. A eritromicina foi eficiente para inibir o crescimento dos isolados e linhagens-padrão e, para a canamicina, todos apre-

sentaram resistência. O antibiótico estreptomicina demonstrou variação de resistência, sendo as linhagens HD73 e CRY(-)B resistentes até à concentração de 100 µg/ml, e os isolados MT6, MT7, SP6, SP8 e PR2, até 60 µg/ml. Estes resultados indicaram que a utilização de eritromicina não foi indicada para isolamentos destas cepas, sendo a canamicina mais promissora para seleção de *B. thuringiensis*. Pelo fato de algumas linhagens de *B. thuringiensis* não serem patogênicas, não há uma caracterização padronizada dos antibióticos quanto às concentrações que determinam suscetibilidade ou resistência. A utilização de antibióticos, associada a outras técnicas, como PCR (CAVALEIRO et al., 2005) e análises de microscopia óptica são utilizadas para caracterizar e identificar novos isolados de *B. thuringiensis* e diferenciá-los de outras bactérias (SILVA-WERNECK & MONNERAT, 2001; MONNERAT et al., 2001, citados por SILVA et al., 2002).

Os iniciadores utilizados na análise por RAPD produziram bandas polimórficas, sendo estas usadas para a elaboração de uma matriz binária que determinou a construção do dendro-

grama observado na Figura 4. Nesta figura, nota-se que os isolados MT7, PR2, MT6, SP6 e SP8 e a linhagem HD-1 apresentaram maior similaridade entre si, formando subgrupos dentro de um grupo maior onde se inseriu a linhagem HD73. O padrão CRY(-)B distanciou-se do grupo por apresentar menor similaridade genética, e a amostra de DNA de planta (P) utilizada como controle diferencial apresentou baixa similaridade com os demais isolados, determinando um grupo distinto, pelo fato de os iniciadores serem aleatórios e apresentarem homologia no genoma total deste organismo. A diferença da linhagem HD73

pode ser atribuída a diversificações no perfil plasmidial e no sítio de restrição além da localização do gene *cry1Ac* em um único plasmídio de 50 MDa (LERECLUS et al., 1993). Os isolados SP8 e SP6 apresentaram 100 % de similaridade, sendo agrupados em um único subgrupo, além de apresentarem características semelhantes em todas as técnicas analisadas. Portanto, a análise por RAPD indicou baixa variabilidade genética entre os isolados. A utilização desta técnica para caracterizar *B. thuringiensis* também foi utilizada por GAVIRIA et al. (2003).

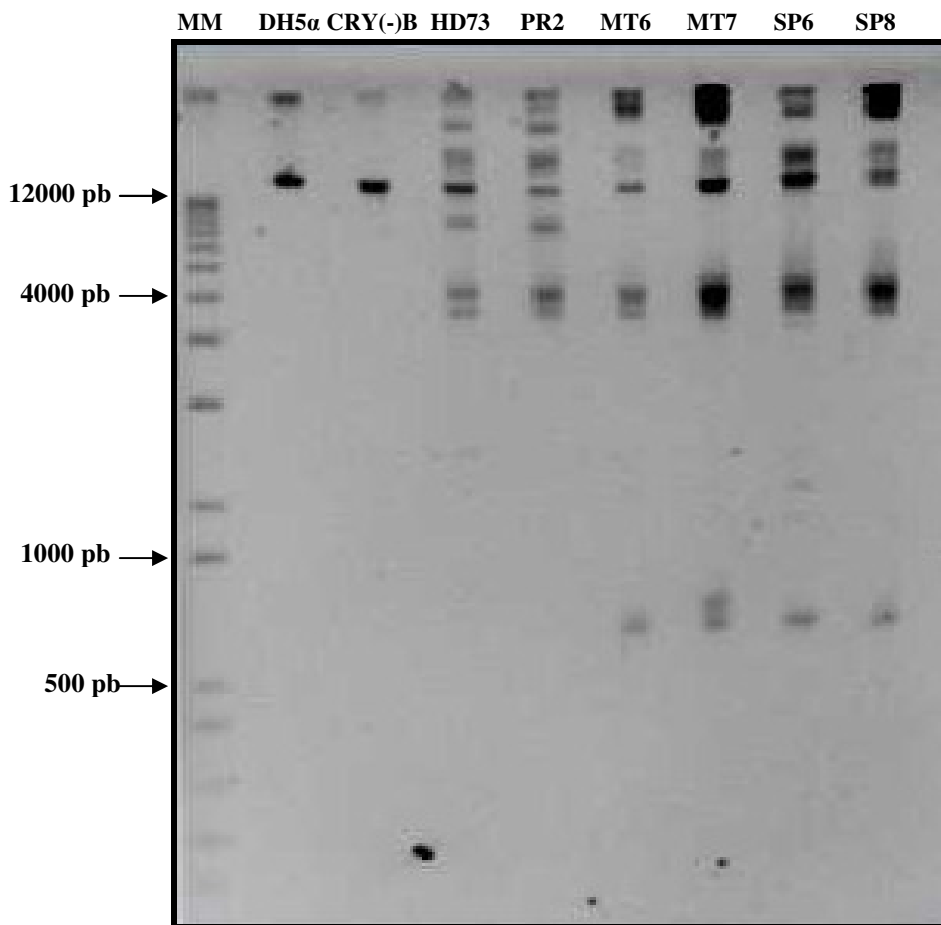


Figura 3 - Perfil plasmidial dos isolados de *B. thuringiensis*. MM-marcador de tamanho molecular “1 kb DNA Ladder®”. Os códigos referem-se aos isolados.

Figure 3 - Plasmid profile of the *B. thuringiensis* isolates. MM – marker of molecular size “1 kb DNA Ladder®”. The codes refer to the isolates.

Nos resultados dos bioensaios (Tabela 2), os isolados SP6, PR2, SP8, MT6, MT7 e a linhagem HD73 não diferiram significativamente entre si, causando 100% de mortalidade, sendo as mais promissoras para o controle de *S. frugiperda*, assim como a linhagem HD-1, a qual tem amplo espectro de atividade larvicida dentro da Ordem Lepidoptera (NAVON, 1993). No entanto,

diversas espécies de *Spodoptera*, pertencentes à Família Noctuidae, são pouco sensíveis a esses agentes (MOAR et al., 1990; INAGAKI et al., 1992; NAVON, 1993; LAMBERT et al., 1996). Os bioensaios demonstraram o potencial patogênico dos isolados e linhagens no controle de lagartas de primeiro instar de *S. frugiperda*. De acordo com LEE et al. (1996), SCHNEPF et al. (1998), a

correlação das subclasses do gene *cry1A* com bioensaios indica que a toxicidade de algumas estirpes aos insetos-alvo pode ocorrer por causa das interações sinérgicas entre as toxinas encontradas ou, mesmo, pela interação destas

com os esporos, tornando-se necessário realizar e analisar bioensaios com proteínas individuais e em conjunto para confirmar a toxina responsável pela mortalidade.

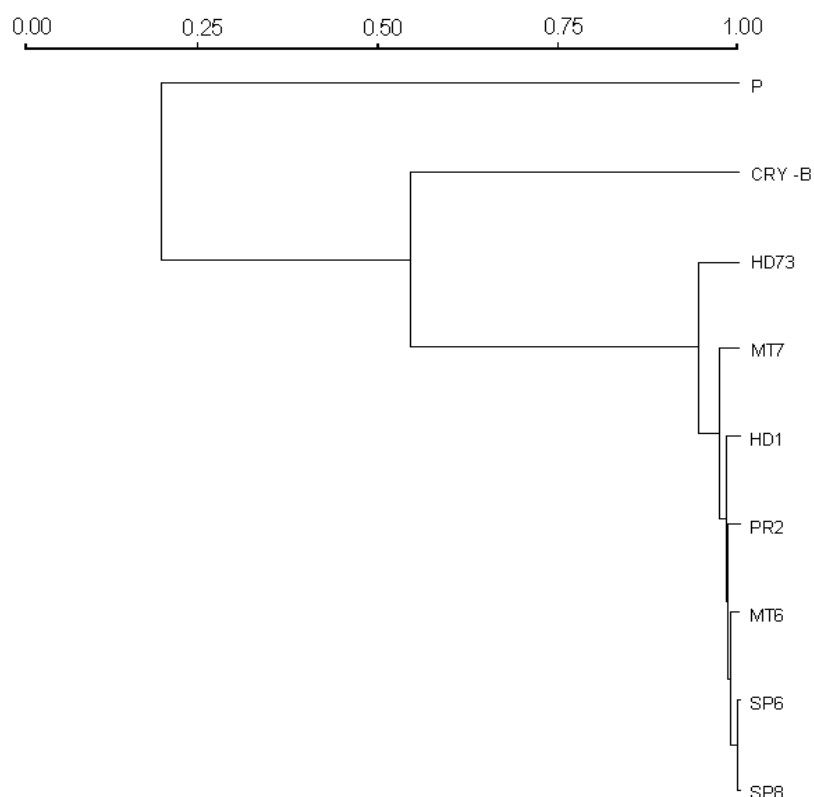


Figura 4 - Dendrograma de similaridade genética entre os isolados de *B. thuringiensis*, obtido pela matriz de similaridade genética. Os códigos referem-se aos isolados.

Figure 4 - Dendrogram of the genetic similarity between the *B. thuringiensis* isolates as indicated by the genetic similarity matrix. The codes refer to the isolates.

Tabela 2 - Mortalidade (\pm EP) de lagartas de *S. frugiperda* (Lep.: Noctuidae) por diferentes isolados de *B. thuringiensis* após cinco dias de inoculação.

Table 2 - *S. frugiperda* (Lep. Noctuidae) caterpillar mortality caused by different isolates of *B. thuringiensis* 5 days after inoculation

Isolados e linhagens de <i>B. thuringiensis</i>	% de mortalidade \pm EP
SP6	100,00 \pm 0,00 A
HD73	100,00 \pm 0,00 A
PR2	100,00 \pm 0,00 A
SP8	100,00 \pm 0,00 A
MT6	100,00 \pm 0,00 A
MT7	100,00 \pm 0,00 A
HD1	100,00 \pm 0,00 A
CRY(-)B	8,00 \pm 3,73 B
Testemunha (água)	8,00 \pm 3,73 B

CV = 6,41%. Médias seguidas por letras distintas diferem 5% entre si pelo teste de Tukey.

CV = 6.41%. Means followed by different letters are significantly different at the 5% level of probability according the Tukey test.

Os resultados dos bioensaios foram confirmados pelos produtos de amplificação das subclasses do gene *cry1A*, aliados à alta similaridade genética mostrada pela análise de RAPD. Uma análise de expressão gênica poderia confirmar o que ocorreu com o isolado PR2, que não amplificou para duas subclasses, mas causou mortalidade como outros isolados.

A linhagem CRY(-)B não apresentou atividade patogênica, podendo ser utilizada como um controle negativo, pois demonstrou mortalidade igual à testemunha. Sua atividade no bioensaio foi confirmada pelos resultados obtidos nas demais técnicas.

Conclusões

Os isolados MT6, MT7, PR2, SP6, SP8 e a linhagem HD73 analisados pelas técnicas de PCR apresentaram a presença do gene *cry1A* e suas subclasses, CMIs, perfil plasmidial, RAPD e bioensaio de patogenicidade, apresentaram alta similaridade genética e foram efetivos no controle de lagartas de primeiro instar de *S. frugiperda*. A linhagem CRY(-)B apresentou baixa similaridade em relação aos outros isolados, não foi efetiva na mortalidade de *S. frugiperda*, tornando-se um controle-padrão neste trabalho e para outras pesquisas.

Referências

BARRETO, M. R. Atividade inseticida do sobrenadante da cultura de cepa de *Bacillus thuringiensis* Berliner contra lagartas de *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Itabuna, v.28, n.4, p.675-685, 1999.

BATISTA, A. C.; MELLATI, V. M.; DEMO, C.; MARTINS, E. S.; PRAÇA, L. B.; GOMES, A. C. M. M.; FALCÃO, R.; BROD, C. S.; MONNERAT, R. G. Prospecção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas no controle de *Anticarsia gemmatilis*. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, Brasília, v.82, n.1, p.19, 2005.

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**, Washington, v.64, n.12, p.4965-4972, 1998.

CAROZZI, N. B.; KRAMER, V. C.; WARREN, G. W.; EVOLA, S.; KOZIEL, M. G. Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis*

strains by polymerase chain reaction product profiles. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.57, n.11, p.3057-3061, 1991.

CAVALEIRO, H.; PRAÇA, L. B.; MARTINS, E. S.; MEDEIROS, P. T.; GOMES, A. C. M. M.; MONNERAT, R. G. Novas estirpes de *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus sphaericus* testadas contra larvas de insetos da ordem lepidóptera e Díptera. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, Brasília, v.87, n.1, p.22, 2005.

DIEZ-RODRIGUES, G. I.; OMOTO, C. Herança da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a lambda-dialotrina. **Neotropical Entomology**, Londrina, v.30, n.2, p.311-316, 2001.

FERRÉ, J.; VAN RIE, J.; Biochemistry and Genetics of Insect Resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review Entomology**, Palto Alto, v.47, p.501-533, 2002.

GAVIRIA RIVERA, A. M.; PRIEST, F. G. Molecular typing of *Bacillus thuringiensis* serovars by RAPD-PCR. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v.26, n.2, p.254-261, 2003.

GLARE, T. R.; O'CALLAGHAN, M. **Bacillus thuringiensis**: biology, ecology and safety. Chichester: John Wiley, 2000. 350 p.

HAMPL, V.; PAVLICEK, A.; FLEGR, J. Construction and bootstrap analysis of DNA fingerprinting-based phylogenetic trees with the free-ware program Free Tree: application to trichomonad parasites. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.51, p.731-735, 2001.

INAGAKI, S.; MIYASONO, M.; ISHIGURO, T.; TAKEDA, R.; HAYASHI, Y. Proteolytic processing of δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 in insensitive insect, *Spodoptera litura*: unusual proteolysis in the presence of sodium dodecyl sulfate. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.60, n.1, p.64-68, 1992.

LAMBERT, B.; BUYSSE, L.; DECOCK, C.; JANSSENS, S.; PIENS, C.; SAEY, B.; SEURINCK, J.; VAN AUDENHOVE, K.; VAN RIE, J.; VAN VLIET, A.; PEFFEROEN, M. A *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein with a high activity against members of the family Noctuidae. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.62, n.1, p.80-86, 1996.

- LEE, M. K.; CURTISS, A.; ALCANTARA, E. A.; DEAN, D. H. Synergistic effect of the *Bacillus thuringiensis* toxins CryIAa and CryIAC on the gypsy moth, *Lymantria dispar*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n.2, p.583-586, 1996.
- LERECLUS, D.; DELECLUSE, A.; LECADET, M. M.; Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. In: ENTWISTLE, P. F.; CORY, J. S.; BAILEY, M. HIGGS, S. (Eds.). **Bacillus thuringiensis an environmental biopesticide: theory and practice**. Chichester: John Wiley, 1993. p.37-70.
- LIGHTFOOT, N. F.; SCOTT, R. J. D.; TURNBULL, P. C. B. Antimicrobial susceptibility of *Bacillus anthracis*. **Medical Bulletin**, Salisbury, v.68, p. 95-98, 1989. Supplement.
- MARMUR, J. A. Procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. **Journal of Molecular Biology**, London, v.3, n. 1, p.208-218, 1961.
- MOAR, W. J.; MASSON, L.; BROUSSEAU, R.; TRUMBULL, J. T. Toxicity to *Spodoptera exigua* and *Trichoplusia ni* of individual P1 protoxins and sporulated cultures of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* HD-1 and NRD-12. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, n.8, p.2480-2483, 1990.
- MONNERAT, R. G.; SILVA, S. F.; WERNWICK, J. O. S.; DIAS, J. M. C. S. **Métodos de coleta, isolamento, caracterização e armazenamento de estirpes de *B. sphaericus***. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. 4 p. (Circular Técnica, 9).
- MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. **Methods in Enzymology**, San Diego, v.55, n.2, p.335-350, 1987.
- NAVON, A. Control of lepidopteran pests with *Bacillus thuringiensis*. In: ENTWISTLE, P. F.; CORY, J. S.; BAILEY, M. J.; HIGGS, S. (Eds.). **Bacillus thuringiensis, an environmental biopesticide: theory and practice**. Chichester: John Wiley & Sons, 1993. p.125-146.
- NEI, M. Definition estimation of fixation indices. **Evolution**, Laurence, v.40, n.3, p.643-645, 1986.
- PAGE, R. D. M. TREEVIEW: an application to display phylogenetic trees on personal computers. **Computer Application in the Bioscience**, Oxford, v.12, p.357-358, 1996.
- PORCAR, M.; JUARÉZ-PÉREZ, V. PCR-based identification of *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal genes. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v.26, n.5, p.419-432, 2003.
- PRAÇA, L. B.; BATISTA, A. C.; MARTINS, E. S.; SIQUEIRA, C. B.; DIAS, D. G. S.; GOMES, A. C. M. M.; FALCÃO, R.; MONNERAT, R. G. Estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos das ordens Lepidóptera, Coleóptera e Díptera. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n.1, 2004.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3rd. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 309 p.
- SÁNCHEZ – YÁÑEZ, J. M.; PENÁ-CABRIALES, J. J. Persistencia de esporas de *Bacillus thuringiensis* en hojas de maíz, de frijol y en el suelo. **Terra Latino Americana**, Mexico, v.18, n.4, p. 325-331, 2000.
- SANCHIS, V.; LERECLUS D.; MENO, G.; CHAUFAUX, J.; LECADET, M. M. Multiplicity of δ endotoxin genes with different insecticidal specificities in *Bacillus thuringiensis aizawai* 7.29. **Molecular Microbiology**, Salem, v.2, n.2, p. 393-404, 1998.
- SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; RIE, J. van; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D. R.; DEAN, D. H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.62, p.775-806, 1998.
- SILVA, S. F.; DIAS, J. M. C. S.; MONNERAT, R. G. **Isolamento, identificação e caracterização entomopatogênica de bacilos de diferentes regiões do Brasil**. Brasília: Embrapa, 2002. 4p. (Comunicado Técnico, 70).
- SILVA-WERNECK, J. O.; MONNERAT, R. G. **Metodologias para caracterização de isolados de *Bacillus thuringiensis***. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. 4p. (Circular Técnica, 10).
- SNEATH, P. H. A.; SOKAL, R. R. **Numerical taxonomy the principles and practice of numerical classification**. San Francisco: W. H. Freeman, 1973. 573p.
- STAHLY, D. P.; DINGMAN, D.W. ; BULLA, L. A.; ARONSON, A. I. Possible origin and function on the parasporal crystals in *Bacillus thuringiensis*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.84, n.3, p.581-588, 1978.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J.; CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, Germany, v.22, n.22, p.4673-4678, 1994.

VILAS-BÔAS, G. T.; LEMOS, M. V. Diversity of cry genes and genetic characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from Brazil. **Canadian Journal Microbiology**. Attawa, v.50, n.8, p.605-613, 2004.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R. K.; LIVAK, J. L. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.18, n.22, p.6531-6535, 1990.

YU, S. J. Detection and biochemical characterization of insecticide resistance in fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.85, n.3, p.675-682, 1992.

ZONTA, E. P.; MACHADO, A. A. SANEST – Sistema de análise estatística para microcomputadores. Pelotas: UFPel, 1984.

Recebido em 23-06-2006

Aceito para publicação em 15-05-2008