

11º ENTEC – Encontro de Tecnologia: 16 de outubro a 30 de novembro de 2017

CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Bacillus thuringiensis* EFICIENTES CONTRA

INSETOS DA ORDEM LEPIDOPTERA

Bruno Pereira Santos¹; Profa. Dra. Ana Maria Guidelli Thuler²

^{1,2} Universidade de Uberaba

bruno.pereira.santos¹ · bpereira955@gmail.com

Resumo

Proteínas inseticidas derivadas de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), formuladas para utilização contra pragas, são os inseticidas biológicos mais amplamente utilizados, sendo que diferentes formulações e a identificação de novos isolados com diferentes toxinas podem promover maior atividade tóxica e melhor resultado do produto em diferentes condições ambientais. O trabalho teve por objetivo a prospecção de genes *cry* e *vip* do banco de isolados de *B. thuringiensis*, do Instituto Federal do Triângulo Mineiro -IFTM- Uberaba/MG. Após a caracterização os novos isolados de *B. thuringiensis* os isolados estudados apresentaram perfis gênicos muito variados, uma vez que pela utilização da análise por PCR foi possível identificar cinco genes *cry*, em 73 isolados de *B. thuringiensis*. Desses, a maior frequência encontrada foi para o gene *cry1Aa* e *cryAc*, encontrado em 17 isolados, seguido por *cry1Ab*, *cry1Ac* e *cry1Fa*, a variação na combinação desses genes formou vários grupos, incluindo os diferentes isolados, sendo possível demonstrar que a maior parte dos isolados apresentaram mais de um gene *cry*. Dentre os 73 isolados, 12,41% dos apresentaram genes *cry1Aa* e *cryAc*, 9,49% foram *cry1Ab* e 0,73% apresentaram *cryDa*. A porcentagem dos isolados que apresentaram gene *vip* foi de 23,36 %, sendo *vip* 2- 5 e *vip* 3 -6 com 11,68 cada um desses genes, por sua constituição genética diferenciada, poderia ser utilizado no manejo de populações de campo resistentes, uma vez que alguns novos

isolados de *B. thuringiensis* apresentam perfis diferenciados dos comumente utilizados em formulações comerciais, quanto ao conteúdo de genes *cry*, como os encontrados nos isolados deste estudo.

Palavras-chave: genes *cry*, genes *vip*, entomopatógenos, controle biológico.

1 Introdução

O controle de insetos, sejam eles nocivos à agricultura ou vetores de doenças humanas, é realizado, quase que exclusivamente, utilizando-se produtos químicos. O uso desses inseticidas vem causando danos ao homem e ao meio ambiente, atingindo inimigos naturais, contaminado alimentos, solo, água e favorecendo uma rápida seleção de insetos resistentes, pois são aplicados, a cada dia, em maiores quantidades e frequência. O sucesso da bactéria *B. thuringiensis* na diversidade de produtos para controle biológico deve-se, em grande parte, ao fato de sua característica tóxica ser referente a proteínas produzidas durante a esporulação. Estas proteínas têm ação sobre pragas de diversas culturas como soja, algodão, gramíneas (pastagens, milho, cana, arroz), brássicas (couve, couve-flor, repolho, brócolis), tomate, fumo, mandioca, café, eucalipto, alfafa, citros, maracujá, seringueira, abacaxi, amendoim, coqueiros e cucurbitáceas (abóbora, pepino, melão, melancia).

Diante disso, o trabalho objetivou a prospecção de genes *cry* e *vip*, para

11º ENTEC – Encontro de Tecnologia: 16 de outubro a 30 de novembro de 2017

lepidópteros, do banco de isolados de *B. thuringiensis*, do Instituto Federal do Triângulo Mineiro -IFTM- Uberaba/MG.

2 Material e Métodos

Foram analisados em torno de 73 isolados de *Bacillus thuringiensis* do banco de isolados do Instituto Federal do Triângulo Mineiro IFTM, Campus Uberaba, MG.

Estocagem dos Isolados

Após a verificação dos isolados quanto a presença de esporos e cristais, colônias de cada isolado completamente esporulados foram coletadas e ressuspensas em 1 mL de água esterilizada e levadas à agitação rigorosa em vórtex até total ressuspensão. Em seguida, tiras de papel filtro esterilizadas foram umedecidas nesta suspensão de células e mantidas em câmara de fluxo laminar até completa secagem. Após secagem, os papéis de filtro impregnados com esporos de cada isolado foram estocados em tubos criogênicos esterilizados (cinco tiras de papel por tubo), devidamente etiquetados e mantidos em estufa tipo B.O.D. a 10 °C.

Cultivo dos isolados e extração de DNA

Os 73 isolados da bactéria *B. thuringiensis* foram previamente crescidos em placas contendo meio NA sólido por uma noite a 30°C. Uma colônia isolada foi ressuspensas em 1ml de água estéril e centrifugada durante 1 minuto a 15.000 Xg a 20°C.

Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e 200 µL do Insta Gene Matrix foram adicionados. Em seguida, o material foi incubado em banho-maria a 56°C por 20 minutos, agitado rigorosamente em vórtex por 10 segundos e incubado em água fervente (100°C) por 8 minutos. O mesmo foi

novamente agitado em vórtex por 10 segundos e centrifugado a 20°C por 3 minutos. Finalmente, 200 µL do sobrenadante foram colhidos, transferidos para uma microplaca e estocados em freezer - 20°C até o momento do uso.

Caracterização molecular dos isolados de *B. thuringiensis*, PCR com primers específicos

As amostras de DNA bacteriano foram submetidas a PCR com iniciadores específicos para os genes cry1Aa, cry1Ab, cry1Ac, cry1D e Cry1F, com base nos descritos na literatura para a Ordem Lepidoptera: Carozzi et al. (1991), Ceron et al. (1994), Ceron et al. (1995), Bravo et al. (1998), Guidelli-Thuler et al (2008); Davolos et al (2009) e para o gene vip3A (LIU et al., 2007).

Todos os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% (SAMBROOK & RUSSEL et al., 2001). Foi aplicada uma amostra de DNA contendo fragmentos de tamanho conhecido, múltiplos de 1 kb (1 kb ladder, GIBCO/BRL), com o objetivo de servir como referência de migração eletroforética para cálculo do tamanho dos fragmentos obtidos nas reações de amplificação. As eletroforeses foram realizadas em cubas horizontais modelos HORIZON 58 e HORIZON 11-14, utilizando tampão TBE. A corrente elétrica de migração foi de aproximadamente 70 V por 2,5 h. Os fragmentos de DNA foram visualizados pela incidência de luz UV, documentados e avaliados usando a imagem negativa. Para verificar a reprodutibilidade da metodologia, depois de padronizadas, foram realizadas três amplificações com cada oligonucleotídeo para cada amostra.

3 Resultados e Discussão

Os isolados estudados apresentaram perfis gênicos muito variados, uma vez que pela utilização da análise por PCR foi possível identificar

11º ENTEC – Encontro de Tecnologia: 16 de outubro a 30 de novembro de 2017

cinco genes *cry*, em 73 isolados de *B. thuringiensis*. Desses, a maior frequência encontrada foi para o gene *cry1Aa* e *cryAc*, encontrado em 17 isolados, seguido por *cry1Ab*, *cry1Ac* e *cry1Fa*.

Assim sendo, as identificações de novos isolados com diferentes toxinas podem promover maior atividade tóxica e melhor resultado do produto em diferentes condições ambientais (MEDEIROS, 2006).

A variação na combinação desses genes formou vários grupos, incluindo os diferentes isolados, sendo possível demonstrar que a maior parte dos isolados apresentaram mais de um gene *cry*. Dentre os 73 isolados, 12,41% dos apresentaram genes *cry1Aa* e *cryAc*, 9,49% foram *cry1Ab* e 0,73% apresentaram *cryDa*. A porcentagem dos isolados que apresentaram gene *vip* foi de 23,36 %, sendo *vip 2- 5* e *vip 3 -6* com 11,68 cada um desses genes (Figura 1).

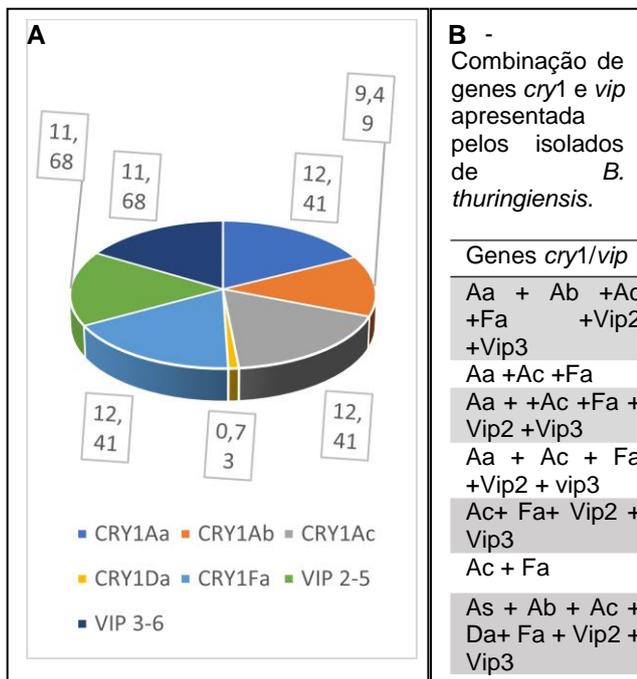


Figura 1: A) Frequência de genes *cry* nos isolados em porcentagens. **B)** Perfil gênico apresentado pelos isolados de *Bacillus thuringiensis*.

Os principais resultados de controle com *B. thuringiensis* var. *kurstaki* foram

obtidos com produtos encontrados no mercado, formulados com essa bactéria, que expressa as toxinas *Cry1Aa*, *Cry1Ab* ou *Cry1Ac*. As ligações dessas toxinas com o epitélio, no intestino do inseto ocorrem através dos mesmos receptores de membrana, facilitando o aparecimento de populações resistentes, o que já vem sendo relatado. O aparecimento de populações de *P. xylostella* resistentes à bactéria, em nível de campo, é cada vez mais frequente em todo o mundo (PEREZ & SHELTON, 1997; TABASHNIK, 1994; WRIGHT et al., 1997; ZHAO et al., 1993), confirmando os resultados obtidos em laboratório, com o surgimento de novas populações resistentes pela pressão de seleção (TANG et al., 1996).

Resultados positivos de controle de *P. xylostella* com *B. thuringiensis* foram observados por CASTELO BRANCO (2003), chegando a 100% de mortalidade para larvas de segundo ínstar de *P. xylostella*. DIAS et al. (2004) também relataram bons resultados para diferentes pragas, em trabalho com *B. thuringiensis* var. *kurstaki* e var. *aizawai*, em formulações comerciais. No entanto, tais resultados são geralmente observados em populações de campos produtores onde produtos a base dessa bactéria não são largamente empregados.

Tendo em vista os casos frequentes de resistência, uma das formas de se manejá-la em populações de campo é a utilização de novos isolados de *B. thuringiensis* que apresentem perfis diferenciados quanto ao conteúdo de genes *cry*, como os encontrados nos isolados deste estudo.

A presença dos diferentes genes *cry* nos isolados estudados, obtidos pela análise de PCR, não significa que os mesmos estão sendo expressos, no entanto dão um forte indício de que estes isolados poderão ser empregados na construção de formulações para

11º ENTEC – Encontro de Tecnologia: 16 de outubro a 30 de novembro de 2017

aplicações em pragas da ordem *lepidóptera*.

5 Conclusão

Neste trabalho foi avaliada a presença de diferentes genes *cry1e vip* nos isolados estudados, obtidos pela análise de PCR. Contudo, isso não significa que os mesmos estão sendo expressos, mas dão um forte indício de que estes isolados poderão ser empregados em programas de controle biológico contra diferentes pragas, o que levaria à formulação dos mesmos ou ainda possibilitaria novos estudos relacionados à expressão e inserção desses genes em plantas, mediante a comprovação de sua atuação nas mortalidades geradas em ensaios.

Referências

BRAVO, A.; SARABIA, S.; LOPEZ, L.; ABARCA C.; ORTIZ, A.; ORTIZ, M.; LINA, L.; VILLALOBOS, F.J.; PEÑA, G.; NUÑEZ-VALDEZ, M.E.; SOBERÓN, 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 insectidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.57, n.11, p.3057-3061, 1991.

CERÓN, J.; COVARRUBIAS, L.; QUINTERO, R.; ORTIZ, A.; ORTIZ, M.; ARANDA, E.; LINA, L.; BRAVO A. PCR analysis of the *cryI* insecticidal crystal family genes from *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.60, n.1, p.353-356, 1994.

DIAS, D. G. S.; SOARES, C. M S.; MONNERAT, R. Avaliação de larvicidas de origem microbiana no controle da traça-das-crucíferas em couve-flor. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 3, p. 553-556, 2004.

GUIDELLI-THULER, A.M.; SENA, J.A.D.; ABREU, I.L.; DAVOLOS, C. C.; ALVES, S. B.; POLANCZYK, R.A.; VALICENTE, F.H.; LEMOS, M.V.F. *Bacillus thuringiensis*: Diversidade Gênica em Isolados Lepidoptera-Específicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.75, p.405-414, 2008.

LIU, J.; SONG, F.; ZHANG, J.; LIU, R.; HE, K.; TAN, J.; HUANG, D. Identification of vip3A-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains and characterization of a novel vip3A-type gene. **Lett. Appl. Microbiol.**, v.45, p.432-438, 2007.

MEDEIROS, P. T. **Estirpes brasileiras de *Bacillus thuringiensis* efetivas no controle biológico da traça-das-crucíferas *Plutella xylostella***. 2004. 82f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, 2004.

11º ENTEC – Encontro de Tecnologia: 16 de outubro a 30 de novembro de 2017

MEDEIROS, P. T.; FERREIRA, M. N.; MARTINS, E. S.; GOMES, A.C. M. M.; FALCÃO, R.; DIAS, J. M. C. S.; MONNERAT, R. G. Seleção e caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas no controle da traça-das-crucíferas *Plutella xylostella*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.40, n.11, p.1145-1148, 2005.

PEREZ, C.J.; SHELTON, A.M. Resistance of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) to *Bacillus thuringiensis* Berliner in Central America. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.90, n.1, p.87-93, 1997.

SAMBROOK, J., MANIATIS, T., FRITSCH, E.F. **Molecular cloning: a laboratory manual**, 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 2001.

SILVA, N.; GUIDELLI-THULER, A.M.; ABREU, I.L.; DAVOLOS, C.C.; POLANCZYK, R.A.; LEMOS, M.V.F. Characterization and selection of *Bacillus thuringiensis* isolates effective against *Sitophilus oryzae*. **Scientia Agricola**, v.67, p.472-478, 2010.

TABASHNIK, B.E. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review**

of Entomology, Stanford, v.39, p.47-79, 1994.

TABASHNIK, B.E.; LIU, Y.B.; MALVAR, T.; HECKEL, D.G.; MASSON, L.; FERRÉ, J. Insect resistance to *Bacillus thuringiensis*: uniform or diverse? **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, London, v.353, n.1376, p.1751-1756, 1998.

THULER, A.M.G.; THULER, R.T.; CÍCERO, E.S.; DE BORTOLI, S.A.; LEMOS, M.V.F. Estudo da variabilidade gênica em isolados brasileiros de *Bacillus thuringiensis* para emprego no controle biológico de *Plutella xylostella*. **Bol. San. Veg. Plagas**, Madrid, v. 33, p.409-417, 2007.

THULER, R. T. ***Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae): táticas para o manejo integrado em brássicas**. 2006, 79f. Tese (Doutorado em Agronomia) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2006.