



MARIA LUCÍLIA MACHADO DA COSTA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
GENES *cyt* DE CEPAS DE *Bacillus
thuringiensis* E AVALIAÇÃO DA
TOXICIDADE DE PROTEÍNAS
INSETICIDAS A *Spodoptera frugiperda* (J.E.
Smith) (Lepidoptera: Noctuidae)**

**LAVRAS – MG
2011**

MARIA LUCÍLIA MACHADO DA COSTA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE GENES *cyt* DE CEPAS
DE *Bacillus thuringiensis* E AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE
PROTEÍNAS INSETIDAS A *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith)
(Lepidoptera: Noctuidae)**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia Vegetal, para
obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Fernando Hercos Valicente

**LAVRAS – MG
2011**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Costa, Maria Lucília Machado da.

Caracterização molecular de genes *cyt* de cepas de *Bacillus thuringiensis* e avaliação da toxicidade de proteínas inseticidas contra *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) / Maria Lucília Machado da Costa. – Lavras : UFLA, 2011.

69 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.

Orientador: Fernando H. Valicente.

Bibliografia.

1. Bactérias entomopatogênicas. 2. Lagarta-do-cartucho. 3. PCR. 4. Controle biológico. 5. Biologia molecular. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 660.63

*À minha família, pela educação, referência, torcida, compreensão da
ausência, dedicação, orgulho e amor incondicional.*

*Ao meu avô Belchior Alves da Costa (in memoriam) e ao amigo Renato
Castro de Morais (in memoriam), minhas primeiras grandes perdas.
Aprender a perder nunca saberemos, mas o tempo transforma todos os
sentimentos.*

*O vazio sempre vai existir, mas a alegria de tê-los tido em minha vida é
muito maior.*

DEDICO

*A todos aqueles que dedicam suas vidas à carreira acadêmica privando-
se, muitas vezes, da presença física dos seus amigos e familiares.*

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida, saúde e fidelidade a mim concedidas.

À Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, pela oportunidade da realização do mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

À Embrapa Milho e Sorgo pela parceria, disponibilidade e oportunidade de desenvolver este trabalho.

Ao Dr. Luciano Vilela Paiva, pela oportunidade da realização do mestrado, bem como pelos valiosos ensinamentos ao longo do curso, sendo uma referência na minha formação.

Ao Dr. Fernando Hercos Valicente, pela orientação, dedicação e confiança a mim depositados, sempre à disposição durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Edilson Paiva pela disponibilidade, aceitando prontamente os convites para membro das bancas de qualificação e defesa, contribuindo grandemente com o trabalho.

Ao Ubiraci Gomes de Paula Lana, o Bira, pelo fundamental apoio durante todo o trabalho, sempre disponível com suas boas ideias e preciosa ajuda.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal da UFLA, pela excelente contribuição intelectual e exemplo profissional.

À minha mãe Ana, por me amar incondicionalmente, pela total dedicação, incentivo, carinho e compreensão da ausência.

Ao meu pai Sérgio, pela amizade, carinho, amor, incentivo e apoio.

À minha avó paterna Maria José, por tudo que sempre fez por mim e pelos meus estudos, sempre com muito amor, atenção, preocupação, incentivo e, principalmente, orgulho.

À minha avó materna Maria Lucília, pelo carinho, amor, atenção e apoio sempre.

Aos meus irmãos Maria Luísa e Sérgio Ricardo, por me orgulharem e simplesmente serem meus irmãos.

A todos os demais familiares pela torcida e demonstração de carinho ao longo de toda minha vida.

Ao meu amigo Carlos, pelo carinho, companhia sempre presente, ajuda nos trabalhos e principalmente paciência.

Aos amigos pernambucanos, dos quais sinto muita falta, pela amizade durante todos esses anos.

Às amigas de república de Lavras Dalíhia e Thaís pela sincera amizade, pelos momentos inesquecíveis e por terem me acolhido com tanto carinho em um momento tão difícil que é sair de casa.

Aos queridos amigos construídos durante o ano de disciplinas em Lavras Nete, Verônica, Jessica, Néia, Gheysa, Ingrid, Gabriel, Horllys, Chris e Rodrigo pela amizade e companheirismo. Em especial ao Gustavo pela ajuda direta ao trabalho.

Às amigas de república de Sete Lagoas Bárbara, Kátia, Mariah, Marina e Thaís pelos bons momentos e acolhimento.

Aos amigos do Laboratório de Controle Biológico da Embrapa Milho e Sorgo Amanda, André, Camila, Celsinho, Kátia e Nate, pelos momentos descontraídos, excelente convívio, apoio nos trabalhos e por

terem me ensinado a trabalhar em equipe. Em especial à Rosane e ao Emerson pela ajuda direta nas ideias para o trabalho e análises.

Aos técnicos do Laboratório de Biologia Molecular e Bioquímica de Plantas da Embrapa Milho e Sorgo Célio, Marília e Miguel, pela ajuda e disponibilidade sempre que preciso.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Milho e Sorgo Belkiss, Brenda, Crísia, Fernandinha, Fernanda, Flávia, Flaviana, Gabi, Janaína, Luciana, Paula e Renato, pela excelente convivência e momentos descontraídos nos intervalos do trabalho.

Aos funcionários da Embrapa Milho e Sorgo, sempre dispostos a ajudar no que for preciso.

O título de mestre é individual, mas a conquista é coletiva, pois nunca seria possível sem a ajuda de todos.

Muito obrigada!

“Ao nos depararmos com coincidências sempre refletimos sobre a existência do destino. Será que ele existe? Ou é tudo coincidência? Quando as coisas dão errado e sofremos, no futuro percebemos que tudo aconteceu exatamente como deveria, pois agora estamos numa situação confortável, bem melhor daquela sentida no momento em que tinha dado errado, e as coisas começam a se encaixar. Eu acredito que existam vários destinos, cabe a nós tomar a iniciativa e escolher o nosso tão sonhado, pois quando os sonhos caminham junto com as atitudes, tornam-se realidade.”

Lucília Machado

RESUMO

O *Bacillus thuringiensis* vem obtendo destaque como alternativa de controle biológico de pragas, como a *Spodoptera frugiperda*, uma das principais pragas da cultura do milho no Brasil. Esta característica deve-se à produção de proteínas inseticidas (Cry e Cyt) durante a fase estacionária. Este trabalho teve por objetivo a caracterização molecular de uma coleção de isolados de *B. thuringiensis* com diferentes toxicidades contra *S. frugiperda* quanto à presença das classes de genes *cyt1* e *cyt2*, bem como algumas de suas subclasses, além de avaliar o efeito das proteínas inseticidas Cry1Ba, Cry1Ca, Cry1Da e Cyt sobre *S. frugiperda*. Das 500 cepas analisadas por PCR, 7 apresentaram genes *cyt*, destas, três contendo genes das duas famílias (*cyt1* e *cyt2*), e quatro apenas uma delas. As cepas que apresentaram as duas famílias gênicas foram efetivas contra *S. frugiperda*, duas com toxicidade de 100% e uma com 79%, as demais possuem 0% de toxicidade. Não foi possível correlacionar a presença/ausência dos genes *cyt* com a toxicidade das cepas à *S. frugiperda*, já que estes estavam presentes em cepas efetivas e não efetivas, entretanto, a presença de genes *cyt* em cepas ativas contra lepidópteros, aponta uma fonte para novos estudos envolvendo expressão gênica e bioensaios, a fim de elucidar o papel real destes genes e sua possível toxicidade. Na avaliação de toxicidade das proteínas Cyt e Cry à *S. frugiperda*, apenas a proteína Cry1Ca foi efetiva contra os indivíduos avaliados, proporcionando mortalidade de 77,08%. As demais apresentaram baixa atividade tóxica, com valores inferiores a 8,3% de mortalidade. A utilização do indutor de expressão IPTG aumentou a mortalidade das lagartas apenas quando associado à ativação das proteínas com tripsina. Em relação ao desenvolvimento das lagartas, apenas nos tratamentos Cry1BaSc e Cry1BaCC não houve diferença significativa em relação à testemunha. Nos demais tratamentos, houve efeito no desenvolvimento, causando redução no peso médio das lagartas. Os menores pesos foram observados em todos os tratamentos utilizando a toxina Cry1Ca. Não foi observado sinergismo positivo entre as proteínas avaliadas, havendo redução na mortalidade em relação às proteínas utilizadas isoladamente. O presente estudo serve como fonte para futuras abordagens envolvendo bioensaios e sinergismo.

Palavras-chave: PCR, genes *cyt*, bactérias entomopatogênicas, controle biológico, lagarta-do-cartucho.

ABSTRACT

Bacillus thuringiensis has been gaining prominence as an alternative biological control of pests such as *Spodoptera frugiperda*, a major pest of corn in Brazil. This capacity is due to their ability to produce insecticidal proteins (Cry and Cyt) during the stationary phase. This work was aimed at the molecular characterization of a collection of *B. thuringiensis* isolates with different toxicities against *S. frugiperda* for the presence of *cyt1* and *cyt2* genes as well as some of its subclasses, and also to evaluate the effect of insecticidal proteins Cry1Ba, Cry1Ca, Cry1Da and Cyt on *S. frugiperda*. Of the 500 Bt strains analyzed by PCR, seven showed *cyt* genes, out of them three containing the two gene families (*cyt1* and *cyt2*), and four only one of them. The strains with the two gene families were effective against *S. frugiperda*, two with toxicity of 100% and one with 79%, the others showed 0% toxicity. It was not possible to correlate the presence /absence of *cyt* genes with toxicity of strains of *S. frugiperda*, since these strains were present in effective and ineffective, however, the presence of *cyt* genes in strains active against lepidopteran, says a source for further studies involving gene expression and bioassay in order to elucidate the actual role of these genes and their possible toxicity. In assessing the toxicity of Cyt and Cry proteins to *S. frugiperda*, just Cry1Ca protein was effective against the tested individuals, with a mortality rate of 77.08%. The others showed low toxicity, with values lower than 8.3% mortality. The use of the expression inducer IPTG increased the mortality of the larvae only when associated with protein activation with trypsin. Regarding the development of the larvae, only in the treatments Cry1BaSc and Cry1BaCC showed no significant difference compared to control. The other treatments had no effect on development, except for causing a reduction in the average weight of larvae. The lowest weights were observed in all treatments using the toxin Cry1Ca. Was not observed positive synergism between the proteins evaluated, with reduction in mortality over proteins used alone. This study serves as a source for future approaches involving bioassays and synergism.

Keywords: PCR, *cyt* gene, entomopathogenic bacteria, biological control, Cyt proteins, Cry proteins, armyworms.

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 Introdução Geral.....	13
1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1	Cultura do milho x lagarta-do-cartucho (<i>S. frugiperda</i>)	16
2.2	<i>Bacillus thuringiensis</i>	17
2.3	δ-endotoxinas	20
2.3.1	Proteínas Cry	21
2.3.2	Proteínas Cyt	23
	REFERÊNCIAS	26
	CAPÍTULO 2 Caracterização molecular de genes <i>cyt</i> de cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	33
	RESUMO	33
	ABSTRACT	34
1	INTRODUÇÃO	35
2	MATERIAL E MÉTODOS	37
2.1	Isolados bacterianos	37
2.2	Extração do DNA genômico	37
2.3	Desenho dos <i>primers</i>	38
2.4	Amplificação do DNA genômico	38
2.5	Sequenciamento de DNA	40
2.6	Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	41
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4	CONCLUSÕES	48
	REFERÊNCIAS	49
	CAPÍTULO 3 Avaliação da toxicidade de proteínas insetidas à <i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae).....	52
	RESUMO	52
	ABSTRACT	53
1	INTRODUÇÃO	54
2	MATERIAL E MÉTODOS	56
2.1	Extração e purificação de proteínas Cry e Cyt	56
2.2	Criação de <i>S. frugiperda</i>	57
2.3	Bioensaios	57
2.4	Análise estatística	59
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
4	CONCLUSÕES	67

REFERÊNCIAS.....	68
-------------------------	-----------

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

O milho é cereal mais cultivado no Brasil, com cerca de 51.382,9 milhões de toneladas de grãos produzidos, em uma área de aproximadamente 12.896,8 milhões de hectares, tornando o país o terceiro maior produtor do grão no mundo, atrás apenas dos Estados Unidos e China, respectivamente (Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB, 2010). A maior parte desses grãos, cerca de 70%, é destinada à cadeia produtiva de suínos e aves, sendo o restante destinado ao consumo humano e à produção de energia através do etanol.

Entretanto, um dos fatores que comprometem o rendimento e a qualidade da produção é a incidência de pragas, gerando prejuízos à lavoura, com importante impacto econômico. A lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), é uma das principais pragas da cultura do milho no Brasil, reduzindo a produção de grãos em até 37% (FATORETTO et al., 2007, p. 737). Ela ocorre durante todos os estádios de desenvolvimento da cultura atacando o cartucho e as folhas, podendo destruí-los completamente (WERNECK et al., 2000, p. 221). O controle desta praga é realizado, em sua maioria, por inseticidas químicos, cuja utilização abusiva desencadeia vários problemas, que vão desde a falta de especificidade dos produtos à poluição ao meio ambiente, podendo ocasionar também, a seleção de populações de insetos resistentes.

Hoje são conhecidos muitos microrganismos com potencial a serem empregados no controle biológico de insetos-praga. Dentre eles, o *Bacillus thuringiensis* destaca-se por apresentar atividade tóxica contra

espécies das ordens Lepidoptera, Diptera, Hymenoptera e Coleoptera, dentre outras, onde se incluem importantes pragas agrícolas brasileiras como *S. frugiperda*, *Diatraea saccharalis* (Fabricius) e *Anticarsia gemmatalis* Hübner (LERECLUS et al., 1993, p. 38). As toxinas produzidas pelo *B. thuringiensis* são altamente específicas aos insetos, sendo inócuas aos humanos, vertebrados e plantas e são biodegradáveis (BRAVO et al., 2007, p. 424). Desta maneira, este microrganismo torna-se uma alternativa viável e econômica para o controle de pragas, evitando a contaminação do meio ambiente, além de preservar os inimigos naturais.

A característica patogênica do *B. thuringiensis* deve-se à produção de uma inclusão protéica de formato cristalino. Esse cristal é sintetizado durante a fase de esporulação, sendo constituído por polipeptídeos denominados δ -endotoxinas (proteínas Cry e Cyt), que vão sendo acumuladas nas células bacterianas (HERRNSTADT et al., 1986, p. 305; IBARRA et al., 2003, p. 5269). Estas proteínas são produzidas por diferentes genes que são específicos a grupos insetos, apresentando um caráter monogênico, facilitando sua manipulação em processos biotecnológicos.

O crescente uso da proteína cristal e sua não toxicidade aos mamíferos têm impulsionado a busca por novas cepas com diferentes espectros de ação. Além disso, existe uma grande preocupação com o manejo preventivo de resistência de insetos-alvo às δ -endotoxinas presentes nos atuais transgênicos comerciais e biopesticidas (CAROZZI et al., 1991, p. 3057).

Estudos envolvendo caracterização molecular, bem como a variabilidade genética existente entre diferentes isolados de *B. thuringiensis*, vêm sendo realizados por diferentes grupos de pesquisa,

principalmente por meio da utilização da PCR (Reação em cadeia da polimerase), auxiliando na descoberta de novos genes com importantes propriedades entomocidas e direcionando os trabalhos de bioensaios (BRAVO et al., 1998, p. 4966; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ et al., 2009).

Este trabalho teve por objetivo a caracterização molecular de uma coleção de isolados de *B. thuringiensis*, com diferentes toxicidades contra *S. frugiperda*, quanto à presença das classes de genes *cyt1* e *cyt2*, bem como algumas de suas subclasses, além de avaliar o efeito das proteínas inseticidas Cry1Ba, Cry1Ca, Cry1Da e Cyt sobre *S. frugiperda*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Cultura do milho x lagarta-do-cartucho (*S. frugiperda*)

O milho (*Zea mays* L.) é o terceiro cereal mais cultivado no mundo, perdendo apenas para o trigo e o arroz, sendo o primeiro no Brasil, com cerca de 51.382,9 milhões de toneladas de grãos produzidos, em uma área de aproximadamente 12.896,8 milhões de hectares, tornando o país o terceiro maior produtor do grão no mundo, atrás apenas dos Estados Unidos e China, respectivamente (Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB, 2010). A maior parte desses grãos, cerca de 70%, é destinada à cadeia produtiva de suínos e aves, sendo o restante destinado ao consumo humano e, mais recentemente, à produção de energia.

Pertencente à família Poacea (Gramineae), o milho é uma espécie monocotiledônea, diplóide e alógama, domesticada num período entre 7.000 a 10.000 mil anos atrás no México e América Central, derivado do *Zea mays* spp. *parviglumis*, conhecido como teosinte (DOEBLEY, 2004, p. 37).

Um dos fatores que comprometem o rendimento e a qualidade da produção do milho é a incidência de pragas, gerando prejuízos à lavoura, com importante impacto econômico. A lagarta-do-cartucho (*S. frugiperda*) é uma das principais pragas da cultura do milho no Brasil e em alguns países da América do Sul e Central, não somente pelos danos provocados, mas especialmente pela dificuldade no seu controle. Ela ocorre durante todos os estádios de desenvolvimento da cultura atacando o cartucho e as folhas, podendo destruí-los completamente, causando perdas de 15% a 37% na produtividade (WERNECK et al., 2000, p.

221). As lagartas mais novas consomem tecidos de folha de um lado, deixando a epiderme oposta intacta, depois do segundo ou do terceiro ínstar, começam a fazer buracos nas folhas produzindo uma fileira de perfurações característica, se alimentando em seguida do cartucho das plantas de milho (VALICENTE, 2008, p. 1).

O controle desta praga é realizado, em sua maioria, por inseticidas químicos, cuja utilização abusiva desencadeia vários problemas, que vão desde a falta de especificidade dos produtos à contaminação ao meio ambiente. Com isso, o controle biológico vem obtendo destaque nos últimos anos, como alternativa a estes produtos.

Vários trabalhos vêm sendo feitos a fim de avaliar a eficiência do *B. thuringiensis* contra a *S. frugiperda*. Valicente et al. (2000), Valicente e Barreto (2003) e Valicente e Fonseca (2004), analisando o efeito do *B. thuringiensis* nas lagartas de *S. frugiperda*, obtiveram resultados de mortalidade de até 100%. Resultados semelhantes foram observados por Fatoreto et al. (2007), onde cerca de 35% dos isolados de *B. thuringiensis* promoveram 100% de mortalidade nas lagartas. Entretanto, é necessária a constante busca por novas cepas eficientes, que possam ser úteis no manejo da resistência de pragas a estas toxinas.

Desta maneira, o *B. thuringiensis* torna-se uma alternativa viável para o controle da *S. frugiperda*, evitando a contaminação do meio ambiente e do homem, além de preservar os inimigos naturais.

2.2 *Bacillus thuringiensis*

Descoberta no início do século XX, a bactéria *B. thuringiensis* passou a ser bastante estudada por microbiologistas e entomologistas devido à sua propriedade entomopatogênica. É uma bactéria Gram

positiva, aeróbica, pertencente à família Bacillaceae, e produz endosporos sob determinadas condições ambientais (ARONSON, 2002, p. 418). Ela encontra-se distribuída em vários substratos como solo, água, superfícies de plantas, insetos mortos, teias de aranha e grãos armazenados (VALICENTE et al., 2000, p. 147).

O *B. thuringiensis* foi descrito pela primeira vez em 1911 por Berliner, sendo isolado do bacilo da lagarta *Anagasta kuehniella*, uma mariposa que se desenvolve na farinha de trigo. Posteriormente, foi nomeado *Bacillus thuringiensis*, em homenagem a província alemã de Thuringia. A primeira tentativa de teste de campo envolvendo o *B. thuringiensis* foi conduzida por Husz em 1929, através de um programa internacional de controle da lagarta europeia do milho, da espécie *Ostrinia nubilalis*, obtendo-se resultados promissores (GLARE; O'CALLAGHAN, 2000, p. 17). A partir daí, o *B. thuringiensis* foi considerado pela indústria, como o primeiro entomopatógeno a ser amplamente explorado como agente de controle biológico. Atualmente, os produtos à base de *B. thuringiensis* representam mais de 90% dos biopesticidas e são usados especialmente em países como os Estados Unidos e Canadá, que juntos representam 50% deste mercado (POLANCZYK; ALVES, 2003, p. 1).

Este microrganismo não é considerado um entomopatógeno com grande agressividade e nem sempre esporula em insetos antes ou após sua morte. Por esse motivo, dificilmente é encontrado causando epizootias naturais em insetos, contudo, foram observados casos isolados envolvendo lepidópteros (PORCAR; CABALLERO, 2000, p. 310). Existe a hipótese de que o *B. thuringiensis* possua algum tipo de relação simbiótica com plantas, fato que explicaria a produção de

proteínas tão específicas e eficientes a grupos de insetos-praga (ARONSON; SHAI, 2001, p. 2).

O *B. thuringiensis* é efetivo contra espécies de insetos das ordens Lepidoptera, Diptera, Hymenoptera, Coleoptera, dentre outras, onde se incluem importantes pragas agrícolas brasileiras como *S. frugiperda*, *Diatraea saccharalis* (Fabricius) e *Anticarsia gemmatalis* Hübner (LERECLUS et al., 1993, p. 38). Diversas estirpes de *B. thuringiensis* vêm sendo isoladas no mundo inteiro, apresentando grande variabilidade genética e uma ampla gama de sorotipos diferentes. Essa busca é contínua e tem sido uma das grandes metas na pesquisa com *B. thuringiensis*, pois objetiva a descoberta de novas cepas mais efetivas e, além disso, que possam auxiliar no manejo preventivo de resistência de insetos-alvo às δ -endotoxinas presentes nos atuais transgênicos comerciais e biopesticidas (CAROZZI et al., 1991, p. 3057).

A característica patogênica do *B. thuringiensis* deve-se à produção de uma inclusão protéica de formato cristalino. Esse cristal é sintetizado em concomitância com a fase de esporulação e é formado por polipeptídeos denominados δ -endotoxinas, também conhecidas como ICPs (Do inglês *Insecticidal Crystal Proteins*), que vão sendo acumuladas nas células bacterianas, podendo totalizar até 1/3 do montante de proteínas da célula (HERRNSTADT et al., 1986, p. 305; IBARRA et al., 2003, p. 5269). Estes cristais, depois de ingeridos pelos insetos, sofrem ativação proteolítica, se solubilizando em decorrência da ação de proteases presentes no intestino. Estas enzimas atuam em pH alcalino, condição esta encontrada no intestino dos insetos (pH ~10), convertendo as protoxinas em toxinas ativas. Estas, por sua vez, unem-se às células do epitélio do intestino formando poros, causando um

desequilíbrio osmótico e iônico, levando à morte do inseto por inanição ou septicemia (BRAVO et al., 2007, p. 426).

O primeiro *B. thuringiensis* produzido comercialmente pertence à subespécie *kurstaki*, eficiente no controle de lepidópteros. Este foi produzido em 1938 na França, fazendo parte de um produto denominado *Sporeine*. Em 1981 foi clonado e expresso o primeiro gene Cry, utilizando a bactéria *E. coli* (SCHNEPF; WHITLEY, 1981). A partir daí foram produzidas as primeiras plantas transgênicas expressando proteínas de *B. thuringiensis* (Cry1Ab e Cry1Ac), merecendo destaque o tomate (FISCHHOFF et al., 1987) e o tabaco (VAECK et al., 1987), ambas desenvolvidas em 1987, com ação contra insetos da ordem Lepidoptera. Atualmente, mais de 300 genes de *B. thuringiensis* foram clonados e sequenciados, e alguns deles, utilizados no desenvolvimento de plantas transgênicas e biopesticidas (CRICKMORE, 2010).

2.3 δ -endotoxinas

As δ -endotoxinas são formadas por duas famílias multigênicas: as toxinas Cry, reconhecidas por receptores específicos presentes na membrana intestinal de insetos, e as toxinas Cyt, que, *in vitro*, lisam um amplo grupo de células, incluindo bactérias (HÖFTE; WHITELEY, 1989, p. 243). Ambas fazem parte de uma classe de toxinas conhecida como PFT (Do inglês *pore-forming toxins*), contudo não apresentam relação filogenética e homologia estrutural, mas possuem propriedades bioquímicas em comum (BRAVO et al., 2007, p. 424). Elas são produzidas e cristalizadas *in vivo* sob pH alcalino e convertidas em toxinas ativas através de clivagens proteolíticas, que removem as regiões N e C-terminais (AL-YAHYAE; ELLAR, 1995, p. 3141). Entretanto,

as proteínas Cry são mediadas por receptores proteína-específicos, enquanto que as proteínas Cyt são mediadas por fosfolípidios insaturados como fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e esfingomelina, interagindo diretamente com a membrana (BRAVO et al., 2007, p. 426).

As δ -endotoxinas são de alta especificidade e produzem diferentes tipos de cristais com formatos cubóide, bipiramidal, esférico, dentre outros (HABIB; ANDRADE, 1998, p. 384). O primeiro pesquisador a detectar a presença de cristais em forma de diamante em culturas esporuladas de *B. thuringiensis* foi Hannay, em 1953, relacionando-os com a patogenicidade dessa bactéria.

2.3.1 Proteínas Cry

Produzidas durante a fase de esporulação, as proteínas Cry são sintetizadas por genes também denominados *cry*. Como descrito anteriormente, estas proteínas apresentam toxicidade a diferentes grupos de insetos. Elas apresentam peso molecular entre 40 e 140 kD (BRAVO, 1997, p. 2793). Atualmente, foram descritas mais de 300 toxinas Cry, cuja classificação é baseada na homologia da sequência de aminoácidos destas proteínas, onde há o agrupamento através de ranques hierárquicos de números e letras. As proteínas são agrupadas no primeiro, segundo e terceiro ranque quando apresentam 98%, 78% e 45% de similaridade, respectivamente. Esses dados são atualizados constantemente podendo ser visualizados no banco de dados *on line* de *B. thuringiensis*, no endereço: http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/.

A estrutura tridimensional das toxinas Cry, obtida através da cristalografia de raios-X, revela três domínios com funções distintas. O domínio I foi descrito pela primeira vez em Cry3Aa por Li et al. (1991),

que sugere que este seja responsável pela inserção da toxina na membrana e consequente formação de poros. O domínio II apresenta grandes diferenças na sua conformação, tamanho e sequência dos *loops* e está relacionado com a especificidade da toxina, sendo responsável pela ligação toxina-membrana (LI et al., 1991, p. 817). Já o domínio III é menos variável, apresentando pequenas diferenças no tamanho, na orientação e sequências dos *loops*, possuindo a função de catalisador da ligação toxina-receptor (BOONSERM et al., 2005, p. 264; PIRES et al., 2004, p. 21560).

O modo de ação das toxinas Cry já é bem caracterizado, principalmente em lepidópteros. O modelo mais aceito é o da formação de poro (BRAVO et al., 2007, p. 426), que sugere que a toxina liga-se a receptores específicos presentes na membrana do intestino médio dos insetos resultando na formação de poros, levando à morte do inseto por inanição ou septicemia. Entretanto, outros modelos vêm sendo propostos. Zhang et al. (2006) sugeriram o modelo da transdução de sinal, onde a interação receptor-toxina estimularia a proteína G e a adenil ciclase, aumentando os níveis de AMP cíclico, ativando a proteína kinase A, responsável pela apoptose, levando à morte do inseto.

As clivagens proteolíticas no intestino do inseto geram toxinas ativas com fragmentos entre 60-70 kD (BRAVO et al., 2005, p. 177). Nesta ativação, são removidas as regiões N-terminais (25-30 aminoácidos em Cry1, 58 em Cry3A e 49 em Cry2Aa) e quase metade da região C-terminal, no caso de proteínas longas (BRAVO et al., 2007, p. 426). Estudos apontam que estas regiões estão envolvidas na formação do cristal e não apresentam relação com a toxicidade do *B. thuringiensis*. São as toxinas ativas que se ligam a receptores específicos de células colunares da membrana do intestino do inseto.

Em lepidópteros foram descritos quatro receptores proteína-específicos: a caderina (CADR), a aminopeptidase-N (APN), a alcalina fosfatase (ALP) e o receptor glico-conjugado (GCR) (BRAVO et al., 2007, p. 426).

O mecanismo mais frequente de resistência de insetos às toxinas Cry envolve mudanças na ligação receptor-toxina. Estudos em *Heliothis virescens*, mostraram que uma simples mutação gerada através da inserção de um retrotransposon no gene da CADR foi responsável por 40-80% de níveis de resistência (GAHAN et al., 2001).

2.3.2 Proteínas Cyt

As proteínas Cyt (codificadas pelos genes *cyt*) são citotoxinas isoladas do *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, assim como as Cry, são sintetizadas durante a fase de esporulação. São encontradas também em menor quantidade em outras subespécies, tais como *kyushuensis*, *jegathesan*, *medeliin*, *morrisoni*, *neoleoensis*, dentre outras (DELÉCLUSE et al., 1995, p. 4230; JUÁREZ-PÉREZ et al., 2002, p. 1228). Em contraste com as toxinas Cry, as Cyt não se ligam a receptores específicos, interagindo diretamente com a membrana lipídica dos insetos, formando poros ou destruindo-na através de ação detergente (BUTKO, 2003, p. 2420).

A proteína Cyt1Aa é a mais estudada e compõe a maior parte do cristal do *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (45-50%). Ela apresenta peso molecular de 28 kD, podendo ser ativada através da utilização de proteases como a proteinase K, gerando um fragmento tóxico de 25 kD (CHOW et al., 1989, p. 2779). No intestino do inseto esta ativação é mediada pela presença da tripsina onde é formada uma

toxina ativa com cerca de 249 aminoácidos (KONI; ELLAR, 1994, p. 1870). Estas proteínas não apresentam homologia na sequência de aminoácidos com as proteínas Cry (BUTKO, 2003, p. 2415). As proteínas Cyt possuem um domínio único, cuja estrutura apresenta uma arquitetura α/β , onde as α -hélices formam uma camada exterior e as folhas- β permanecem encobertas dentro do interior da proteína (LI et al., 1996, p. 816). A proteína Cyt1Aa tem sua atividade citolítica atribuída à hidrofobicidade e habilidade de se ligar a fosfolipídios (BRAVO et al., 2007, p. 426). Segundo estes autores, a proteína é inserida na membrana através da criação de canais cátion-seletivos com cerca de 1–2 nm de diâmetro, levando à lise osmótica.

Até o presente foram descritas dez toxinas Cyt, pertencentes a três classes, Cyt1, Cyt2 e Cyt3 (Cyt1Aa, -1Ab, -1Ba, -1Ca, -2Aa, -2Ba, -2Bb, -2Bc, -2Ca e -3Aa) (CRICKMORE, 2010). Assim como as proteínas Cry, as Cyt são agrupadas em classes ou ranques de acordo com a similaridade na sequência de aminoácidos.

Estudos apontam que as proteínas Cyt agem de forma sinérgica com as proteínas Cry, atuando como receptores adicionais destas, potencializando sua ação (OESTERGAARD et al., 2007, p. 3623). O mecanismo proposto é que as proteínas Cyt se ligam à membrana do inseto deixando expostas regiões que são reconhecidas pelas proteínas Cry, facilitando a oligomerização destas, e conseqüentemente a formação de poros (PÉREZ et al., 2005). Em *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* esta ligação ocorre no loop α -8 do domínio II da proteína Cry11Aa que também está relacionado com a interação desta com o receptor da fosfatase alcalina (FERNÁNDEZ et al., 2005). Mutações nesta região afetam esta interação específica, reduzindo o sinergismo entre estas proteínas (PÉREZ et al., 2005).

A sinergia Cyt/Cry é maior que as interações entre proteínas Cry (CRICKMORE et al., 1995, p. 250). Wu et al. (1994) expressando várias combinações de genes Cyt/Cry, observou um incremento de quatro vezes na atividade tóxica das proteínas, em relação às proteínas Cry utilizadas isoladamente. Outros trabalhos demonstram também que as proteínas Cyt não apresentam ação tóxica quando utilizadas isoladamente e não são determinantes para a toxicidade da cepa. Delécluse et al. (1991) silenciaram o gene *cyt1Aa* do *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* na tentativa de eliminar sua atividade inseticida contra dípteros, fato este que não ocorreu. A maioria dos estudos envolvendo genes *cyt* mostra que estes são eficientes contra dípteros (PÉREZ et al., 2005), apontando seu importante papel no controle destes grupos. Entretanto genes *cyt* foram identificados em cepas de *B. thuringiensis* tóxicas a lepidópteros e coleópteros (GUERCHICOFF et al., 1997, 2001). Estes autores encontraram o gene *cyt2Ba* em uma cepa de *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis*, sendo este, efetivo contra coleópteros. Esses resultados mostram a necessidade de mais testes envolvendo outros grupos, como por exemplo, os lepidópteros.

3 REFERÊNCIAS

AL-YAHYAEE, S. A. S.; ELLAR, D. J. Maximal toxicity of cloned CytA δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* requires proteolytic processing from both the N- and C-termini. **Microbiology**, Reading, v. 141, p. 3141-3148, dec. 1995.

ARONSON, A. Sporulation and delta-endotoxin synthesis by *Bacillus thuringiensis*. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Heidelberg, v. 59, n. 3, p. 417-425, mar. 2002.

ARONSON, A. I.; SHAI, Y. Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action. **FEMS Microbiology Letters**, Delft, v. 195, n. 1, p. 1-8, feb. 2001.

BOONSERM, P. et al. Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 348, n. 2, p. 363-382, may 2005.

BRAVO, A. Phylogenetic relationships of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin family proteins and their functional domains. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 179, n. 9, p. 2793-2801, may 1997.

BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. *Bacillus thuringiensis* mechanisms and use. In: GILBERT, L. I.; IATROU, K.; GILL, S. S. (Ed.). **Comprehensive molecular insect science**. California: Elsevier BV, 2005. p. 175-206.

BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, Cuernavaca, v. 49, p. 423-435, mar. 2007.

BRAVO, A. et al. Characterization of *cry* genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 12, p. 4965-4972, dec. 1998.

BUTKO, P. Cytolytic toxin Cyt1A and its mechanism of membrane damage: data and hypotheses. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 5, p. 2415-2422, may 2003.

CAROZZI, N. B. et al. Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polimerase chain reaction product profiles. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, n. 11, p. 3057-3061, nov. 1991.

CHOW, E.; SINGH, G. J. P.; GILL, S. S. Binding and aggregation of the 25-kilodalton toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* to cell membranes and alteration by monoclonal antibodies and amino modifiers. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 55, n. 11, p. 2779-2788, nov. 1989.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. CONAB. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos, sexto levantamento**. Brasília, 2010. 42 p.

CRICKMORE, N. **Bt toxin nomenclature**. Falmer, 2010. Disponível em: <http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/>. Acesso: 03 nov. 2010.

CRICKMORE, N. et al. Contribution of the individual components of the δ -endotoxin crystal to the mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **FEMS Microbiology Letters**, Delft, v. 131, n. 3, p. 249-254, sept. 1995.

DELÉCLUSE, A.; JUÁREZ-PÉREZ, V.; BERRY, C. Vector-active toxins: structure and diversity. In: CHARLES, J. F.; DELÉCLUSE, A.;

NIELSEN-LE ROUX, C. (Ed.). **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application**. Dordrecht: Kluwer, 2000. p. 101-125.

DELÉCLUSE, A.; ROSSO, M-L.; RAGNI, A. Cloning and expression of a novel toxin gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *jegathesan* encoding a highly mosquitocidal protein. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 12, p. 4230-4235, dec. 1995.

DELÉCLUSE, A. et al. Deletion by in vivo recombination shows that the 28-kilodalton cytolytic polypeptide from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* is not essential for mosquitocidal activity. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 173, n. 11, p. 3374-3381, jun. 1991.

DOEBLEY, J. The genetics of maize evolution. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 38, n. 1 p. 37-59, dec. 2004.

FATORETTO, J. C. et al. Associação de bioensaios e caracterização molecular para seleção de novos isolados de *Bacillus thuringiensis* efetivos contra *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology**, Piracicaba, v. 36, n. 5, p. 737-745, out. 2007.

FERNÁNDEZ, L. E. et al. Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* binds its receptor in *Aedes aegypti* mosquito larvae trough loop a-8 of domain II. **FEBS Letters**, Heidelberg, v. 579, n. 17, p. 3508-3514, jul. 2005.

FISCHHOFF, D. A. et al. Insect tolerant transgenic tomato plants. **Nature Biotechnology**, New York, v. 5, p. 807-813, aug. 1987.

GAHAN, L. J.; GOULD, F.; HECKEL, D. G. Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*. **Science**, Washington, v. 293, n. 5531, p. 857-860, aug. 2001.

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

GUERCHICOFF, A.; UGALDE, R. A.; RUBINSTEIN, C. P. Identification and characterization of a previously undescribed *cyt* gene in *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 7, p. 2716-2721, jul. 1997.

GUERCHICOFF, A.; DELECLUSE, A.; RUBINSTEIN, C. P. The *Bacillus thuringiensis cyt* genes for hemolytic endotoxins constitute a gene family. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 3, p. 1090-1096, mar. 2001.

HABIB, M. E. M.; ANDRADE, C. F. S. Bactérias entomopatogênicas. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: Fealq, 1998. p. 383-446.

HANNAY, C. L. Crytalline inclusions in aerobic spore-forming bacteria. **Nature**, London, v. 172, n. 4387, p. 1004-1005, nov. 1953.

HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C. S. et al. Screening and identification of *vip* genes in *Bacillus thuringiensis* strains. **Journal of Applied Microbiology**, Washington, v. 107, n. 1, p. 219-225, jul. 2009.

HERRNSTADT, C. et al. A new strain of *Bacillus thuringiensis* with activity against Coleopteran insects. **Nature Biotechnology**, New York, v. 4, p. 305-308, apr. 1986.

HÖFTE, H.; WHITELEY, H. R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 53, n. 2, p. 242-255, jun. 1989.

IBARRA, J. et al. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Latin America with insecticidal activity against different mosquito species. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 9, p. 5269-5274, sept. 2003.

JUÁREZ-PÉREZ, V. et al. Characterization of Cyt2Bc toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 3, p. 1228-1231, mar. 2002.

KONI, P. A.; ELLAR, D. J. Biochemical characterization of *Bacillus thuringiensis* cytolytic delta-endotoxins. **Microbiology**, Reading, v. 140, p. 1869-1880, aug. 1994.

LERECLUS, D.; DELÉCLUSE, A. E.; LECADÉT, M. M. Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. In: ENWISTLE, P. F. et al. (Ed.). ***Bacillus thuringiensis, an environmental biopesticide: theory and practice***. West Sussex: John Wiley e Sons, 1993. p. 37-69.

LI, J. D.; CARROLL, J.; ELLAR, D. J. Cristal structure of insecticide delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2,5 Å resolution. **Nature**, London, v. 353, n. 6347, p. 815-821, oct. 1991.

LI, J.; KONI, P. A.; ELLAR, D. J. Structure of insecticidal δ -endotoxin Cyt B from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kyushuensis* and implications for membrane pore formation. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 257, p. 129-152, mar. 1996.

OESTERGAARD, J. et al. Binding of Cyt1Aa and Cry11Aa Toxins of *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* to brush border membrane vesicles of *Tipula paludosa* (Diptera: Nematocera) and subsequent pore formation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, n. 11, p. 3623-3629, jun. 2007.

PÉREZ, C. et al. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cry11Aa and Cyt1Aa toxins interactions support the synergism-model that Cyt1Aa

functions as membrane bound receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 102, n. 51, p. 18303-18318, jun. 2005.

PIRES, V. M. et al. The crystal structure of the family 6 carbohydrate binding module from *Cellvibrio mixtus* endoglucanase 5a in complex with oligosaccharides reveals two distinct binding sites with different ligand specificities. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 279, p. 21560-21568, mar. 2004.

POLANCZYK, R.; ALVES, S. B. *Bacillus thuringiensis*: uma breve revisão. **Agrociencia**, Texcoco, v. 7, n. 2, p. 1-10, set. 2003.

PORCAR, M.; CABALLERO, P. Molecular and insecticidal characterization of a *Bacillus thuringiensis* strain isolated during a natural epizootic. **Journal of Applied Microbiology**, Washington, v. 89, n. 2, p. 309-316, aug. 2000.

SCHNEPF, E.; WHITELEY, H. R. Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 78, n. 5, p. 2893-2897, may 1981.

VAECK, M. et al. Transgenic plants protected from insect attack. **Nature**, London, v. 328, p. 33-37, jul. 1987.

VALICENTE, F. H. **Controle biológico da lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda*, com *Bacillus thuringiensis***. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, v. 105, p. 1-9, dez. 2008.

VALICENTE, F. H.; BARRETO, M. R. *Bacillus thuringiensis* survey in Brazil: geographical distribution and insecticidal activity against *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology**, Piracicaba, v. 32, n. 4, p. 639-644, out. 2003.

VALICENTE, F. H.; FONSECA, M. M. Susceptibilidade da lagarta-do-cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda*, a diferentes isolados de *Bacillus thuringiensis*. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 3, n. 1, p. 21-29, dez. 2004.

VALICENTE, F. H. et al. Identificação através de PCR dos genes *cryI* de cepas de *Bacillus thuringiensis* Berliner eficientes contra a lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Piracicaba, v. 29, n. 1, p. 147-153, mar. 2000.

WERNECK, J. O. S. et al. Novo isolado de *Bacillus thuringiensis* efetivo contra a lagarta-do-cartucho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 1, p. 221-227, jan. 2000.

WU, D.; JOHNSON, J. J.; FEDERICI, B. A. Synergism of mosquitoicidal toxicity between CytA and CryIVD proteins using inclusions produced from cloned genes of *Bacillus thuringiensis*. **Molecular Microbiology**, Malden, v. 13, n. 6, p. 965-972, sept. 1994.

ZHANG, X. et al. A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 103, n. 26, p. 9897-9902, jun. 2006.

CAPÍTULO 2

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE GENES *cyt* DE CEPAS DE *Bacillus thuringiensis*

RESUMO

A bactéria *Bacillus thuringiensis* é amplamente utilizada no controle biológico de insetos praga, destacando-se por apresentar atividade tóxica contra espécies de diversas ordens, resultante da produção de δ -endotoxinas (proteínas Cry e Cyt). O presente trabalho teve por objetivo a caracterização molecular de uma coleção de isolados de *B. thuringiensis* com diferentes toxicidades contra *Spodoptera frugiperda* quanto à presença das classes de genes *cyt1*, *cyt2* e algumas de suas subclasses. Para isso, 500 cepas de *B. thuringiensis* foram cultivadas em meio LB sólido por dezesseis horas a 28°C. Com uma alça de platina foram coletadas pequenas amostras de colônias e transferidas para um microtubo contendo 100 μ l de água ultra pura estéril. O DNA das cepas foi extraído utilizando-se a metodologia de choque térmico, sendo o sobrenadante utilizado nas reações de PCR. Para a amplificação, foram utilizados seis pares de *primers*, correspondendo aos genes *cyt1*, *cyt1Aa*, *cyt1Ab*, *cyt2*, *cyt2B* e *cyt2Ba*. Adicionalmente, foi feita a extração de proteínas e eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Das 500 cepas analisadas, sete apresentaram genes *cyt*, destas, três contendo genes das duas famílias (*cyt1* e *cyt2*), e quatro apenas uma delas. As cepas que apresentaram as duas famílias gênicas são efetivas contra *S. frugiperda*, duas com toxicidade de 100% e uma com 79%, as demais apresentaram 0% de toxicidade. No presente trabalho, não foi possível relacionar a presença/ausência dos genes *cyt* com a toxicidade das cepas à *S. frugiperda*, já que estes foram presentes em cepas efetivas e não efetivas. Tendo em vista que os genes *cyt* são efetivos contra dípteros, a sua presença em cepas ativas contra lepidópteros, aponta uma fonte para novos estudos, apresentando-se como uma alternativa no manejo preventivo de resistência de insetos alvos às δ -endotoxinas presentes em culturas transgênicas comerciais.

Palavras-chave: PCR, bactérias entomopatogênicas, controle biológico, genes *cyt*.

**MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *cyt* GENES OF
Bacillus thuringiensis STRAINS**

ABSTRACT

The bacterium *Bacillus thuringiensis* is widely used in biological control of pests, especially by having toxic activity against species of various orders of insects, resulting in the production of δ -endotoxins (Cry and Cyt proteins). The aim of this work was to characterize a collection of *B. thuringiensis* strains with different toxicity against *Spodoptera frugiperda* for the presence of genes *cyt1*, *cyt2* and some of its subclasses. For this, 500 *B. thuringiensis* strains were grown in LB solid for sixteen hours at 28°C. With a platinum loop, small samples of colonies were collected and transferred to a microtube containing 100 μ l of sterile ultrapure water. The DNA was extracted using the method of thermal shock, the supernatant was used in PCR reactions. For amplification, six pairs of primers corresponding to *cyt1*, *cyt1Aa*, *cyt1Ab*, *cyt2*, *cyt2B* and *cyt2Ba* genes were used. Additionally, we extract proteins and analyzed them using polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Of the 500 strains analyzed by PCR, seven showed *cyt* genes, these three containing the two gene families (*cyt1* and *cyt2*), and four only one of them. The strains with the two gene families were effective against *S. frugiperda*, two with toxicity of 100% and one 79%, the others showed 0% toxicity. In this study, we could not correlate the presence/absence of *cyt* genes with toxicity of strains of *S. frugiperda*, since these genes were present in effective and ineffective strains. Considering that *cyt* genes are known to be effective against flies, their presence in strains active against lepidopteran, provide a source for new studies, appearing as an alternative to prevent insect resistance to the δ -endotoxins present in transgenic crops.

Keywords: PCR, entomopathogenic bacteria, biological control, *cyt* genes.

1 INTRODUÇÃO

A bactéria *Bacillus thuringiensis* vem sendo utilizada como alternativa ao controle químico de pragas, empregada na produção de biopesticidas ou na utilização de seus genes no desenvolvimento de plantas transgênicas. Este microrganismo destaca-se por apresentar atividade tóxica contra insetos de diferentes ordens, como a Lepidoptera, onde se incluem importantes pragas agrícolas brasileiras como a *Spodoptera frugiperda*, *Diatraea saccharalis* (Fabricius) e *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (LERECLUS et al., 1993, p. 38). Esta toxicidade é resultante da produção de δ -endotoxinas (proteínas Cry e Cyt), cujo modo de ação já é bastante caracterizado (BRAVO et al., 2007, p. 426).

A PCR (*Polymerase Chain Reaction*) vem sendo amplamente utilizada em estudos de variabilidade genética entre diferentes isolados de *B. thuringiensis*, auxiliando na identificação e caracterização de genes codificadores de δ -endotoxinas, direcionando os trabalhos de bioensaio. Esta técnica foi primeiramente utilizada com esses fins por Carozzi et al. (1991, p. 3057). Atualmente, a PCR é aplicada rotineiramente nos laboratórios de todo o mundo. Seu sucesso é atribuído à sua grande reprodutibilidade e solidez nas informações moleculares, bem como na sua utilidade na predição da atividade inseticida de isolados de *B. thuringiensis*. Além disso, essa técnica permite um rápido e simultâneo *screening* de genes em grandes coleções de isolados (VIDAL-QUIST et al., 2009, p. 749).

Diversas estirpes de *B. thuringiensis* vêm sendo isoladas no mundo inteiro, apresentando grande variabilidade genética e uma ampla gama de sorotipos diferentes. A Embrapa Milho e Sorgo (CNPMS)

possui uma coleção de isolados de *B. thuringiensis* com cerca de 3000 cepas provenientes de coletas realizadas em diversas regiões do Brasil, e em diferentes substratos, como solo, pastagem, lagartas mortas e folhas, e estas vêm sendo caracterizadas através de estudos com PCR utilizando marcadores moleculares como REP-PCR (SILVA, 2009), AFLP (Dados não publicados) e PCR *primer* específico (VALICENTE et al., 2000; VALICENTE et al., 2010), além de estudos analisando o perfil plasmidial (SILVA, 2009). Estes trabalhos objetivam a prospecção de cepas e genes com potencial uso no controle da *S. frugiperda*, uma das principais pragas da cultura do milho no Brasil e alguns países da América do Sul e Central.

Desta maneira, o presente trabalho teve por objetivo a caracterização molecular de uma coleção de isolados de *B. thuringiensis* com diferentes toxicidades contra *S. frugiperda* quanto à presença das classes de genes *cyt1*, *cyt2* e algumas de suas subclasses.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Isolados bacterianos

Foram utilizadas 500 cepas de *B. thuringiensis* com diferentes toxicidades para *S. frugiperda* (0% a 100%), de acordo com Valicente et al. (2000), Valicente e Barreto (2003), Valicente e Fonseca (2004) e Valicente et al. (2010), sendo estas pertencentes à coleção da Embrapa Milho e Sorgo (CNPMS). As cepas são provenientes de coletas realizadas em diversas regiões do Brasil, e em diferentes substratos, como solo, lagartas mortas, folhas, etc. Adicionalmente, foram utilizadas cepas oriundas de outros países, como França e Estados Unidos, pertencentes ao *Institut Pasteur* (Paris, França) e ao *United States Department of Agriculture* (USDA) (Columbus, OH), respectivamente. Como controle positivo foi utilizada uma cepa de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, proveniente da Unesp - Jaboticabal e como controle negativo a cepa HD1, proveniente do USDA.

2.2 Extração do DNA genômico

O DNA genômico das cepas de *B. thuringiensis* foi isolado de acordo com Bravo et al. (1998), com algumas modificações. As cepas foram plaqueadas em meio LB (Lurian Bertani) sólido por aproximadamente 16 horas à temperatura de 28°C. Com uma alça de platina foi coletada uma pequena amostra e transferida para um microtubo contendo 100 µl de água ultra pura estéril. Em seguida, os microtubos foram estocados em freezer -80°C por 15 minutos. Após este período, os tubos foram levados ao banho-maria com água fervente

por 10 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 segundos, e o sobrenadante coletado e utilizado nas reações de PCR.

2.3 Desenho dos *primers*

Foram utilizados *primers* descritos por Ibarra et al. (2003), bem como outros desenhados a partir de sequências dos genes depositadas no banco de dados de *B. thuringiensis* disponível na página http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/index.html (Tabela 1). Para tanto, foram utilizados os programas PRIMER 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) e Net Primer (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/index.html>). Os *primers* foram desenhados a partir de regiões aleatórias altamente variáveis dos genes.

2.4 Amplificação do DNA genômico

Nas reações de amplificação foram utilizados *primers* específicos para as classes de genes *cyt1* e *cyt2*, descritos por Ibarra et al. (2003), bem como os *primers* desenhados para a subclasse *cyt2B* e para os genes *cyt1Aa*, *cyt1Ab* e *cyt2Ba* (Tabela 1). As reações de PCR foram preparadas em um volume final de 20 µL, consistindo de 5 µl de DNA; 20 mM Tris-HCl (pH 8,4); 50 mM KCl; 2,5 mM MgCl₂; 1 U Taq DNA polimerase (Waterville, USA), 0,125 mM de dNTPs e 0,4 µM de cada primer. As amplificações foram efetuadas em termociclador Mastercycler (Eppendorf, Hanburg, Germany) e os ciclos de amplificação foram: desnaturação inicial a 95°C por 2 min, 30 ciclos de

95°C por 1 min, 50°C (*cyt2B* e *cyt2Ba*), 52°C (*cyt1Ab*), 55°C (*cyt1Aa*), 56°C (*cyt2*) ou 58°C (*cyt1*) por 1 min e 72°C por 1 min, seguido por uma alongação final de 72°C por 10 minutos, mantendo a reação à 4°C.

Tabela 1 *Primers cyt* utilizados nas cepas de *B. thuringiensis*.

<i>Primer</i>	T°C Anel	Sequência (5' – 3')	pb	Genes	Nº Acesso GenBank
<i>cyt1*</i>	58	CCTCAATCAACAGCAAGGGTTATT(d) TGCAAACAGGACATTGTATGTGTAATT(r)	480	<i>cyt1Aa</i> , <i>cyt1Ab</i> e <i>cyt1Ba</i>	X03182, X98793 e U37196
<i>cyt2*</i>	56	ATTACAAATTGCAAATGGTATTCC(d) TTTCAACATCCACAGTAATTTCAAATGC(r)	355	<i>cyt2Aa</i> , <i>cyt2Ba</i> , <i>cyt2Bb</i> e <i>cyt2Ca</i>	Z14147, U52043, U82519 e AAK50455
<i>cyt1Aa</i>	55	TGCATTAGTTCCTACTTACAGAT(d) TACAGATCCACTTAATGCAACTCCT(r)	214	<i>cyt1Aa</i>	EF656359.1
<i>cyt1Ab</i>	52	AATGAAGCGTGGATTTCTG(d) CTGTGCGAATTCAAGGATT(r)	222	<i>cyt1Ab</i>	X98793.1
<i>cyt2B</i>	50	GGGTAGATTATGGCAGTA(d) ATAATTCGGACGATGTAAG(r)	208	<i>cyt2Ba</i> e <i>cyt2Bc</i>	GQ919041.1 e AJ251979.1
<i>cyt2Ba</i>	50	CAGGAACTCTTAATCAAAGTGAAT(d) CATCTACTTGAGGTCTAAATTTGT(r)	177	<i>cyt2Ba</i>	GQ919041.1

(d) direito; (r) reverso

* *Primers* utilizados por Ibarra et al. (2003)

Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose 1,5 % (m/v) em tampão TAE (40 mM Tris-acetato; 1 mM EDTA, pH 8,0). Após a eletroforese realizada a 100 V durante uma hora, o gel foi incubado em solução de brometo de etídio (1 µg/mL) por 15 minutos, visualizado sob luz ultravioleta e fotografado no equipamento Gel Logic 200 (Kodak, New York, USA).

2.5 Sequenciamento de DNA

Para confirmação da identidade dos fragmentos, estes foram removidos do gel e purificados com “QIAquick Gel Extraction Kit” (Qiagen, Valencia, CA) segundo as recomendações do fabricante. As amostras foram então eluídas em 50 μ L de tampão EB (Qiagen, Valencia, CA), liofilizadas em centrífuga a vácuo e ressuspensas em 10 μ L de água ultra-pura.

As reações de sequenciamento foram preparadas utilizando-se o BigDye Terminator v3. Cycle Sequencing Kit, a partir de 50 e 100 ng do DNA purificado; 2 μ L de BigDye V3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA); 2 μ L do tampão 5X (Applied Biosystems, Foster City, CA) e 5 μ mol do iniciador, em um volume final de 10 μ L. As reações foram submetidas a 96 °C por 20 segundos, 50 °C por 15 segundos, 60 °C por 4 minutos, repetidos por 30 vezes.

Posteriormente, 40 μ L de isopropanol 75 % (v/v) foram adicionados a cada amostra, sendo incubadas durante 20 minutos no escuro e centrifugadas por 20 minutos a 16000 x g, descartando-se o sobrenadante. Foram adicionados 100 μ L de etanol 70 % (v/v) ao precipitado, sendo os microtubos centrifugados a 16000 x g por 20 minutos, o sobrenadante removido e as amostras secas à temperatura ambiente no escuro. Em seguida, foram ressuspensas em 10 μ L de formamida HiDi (Applied Biosystems, Foster City, CA), desnaturadas a 95 °C por 5 minutos e mantidas no gelo até a injeção no equipamento ABI 3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

A qualidade das sequências foi avaliada pelo programa Seqman 3.57 (DNASTAR, Madison, WI) e as sequências selecionadas foram

comparadas com sequências depositadas no GenBank por meio do algoritmo BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

2.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

As proteínas foram isoladas das cepas de *B. thuringiensis* subesp. *israelensis* segundo Valicente et al. (2010). As bactérias foram inoculadas em meio líquido LB a 28°C por quatro dias sob agitação 150 rpm. Em seguida, as culturas foram centrifugadas a 14000 rpm por 5 minutos, sendo o sobrenadante descartado e o *pellet* ressuscitado em 1 mL de Triton 0,01% (v/v). Esta etapa foi repetida três vezes. Após essa lavagem, o *pellet* foi solubilizado em 500 µl do tampão (0,01% Triton, 10 mM NaCl e 50 mM Tris-HCl, pH 8.0). As amostras foram centrifugadas a 14000 rpm por 5 minutos, e o *pellet* ressuscitado em 500 µl do tampão (50 mM bicarbonato de sódio e 10mM β-mercapetanol, pH 10,5) e mantido em agitação a 37°C por três horas. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 14000 rpm por 10 minutos. Em seguida, o *pellet* foi ressuscitado em 250 µl de Tris pH 8.0 0,1M. Ao final da extração, a proteína foi ativada utilizando tripsina (0,5µg µl⁻¹). A solução foi mantida em agitador a 150 rpm a 37°C por duas horas. Ao final, a reação foi inativada utilizando 0,15 mM PMSF (Fenil metil sulfonil fluorido).

Alíquotas das proteínas foram misturadas a igual volume de tampão (0,0625 M Tris, 2,3% SDS (m/v), 10% (v/v) glicerol, 5% (v/v) β-mercaptoetanol e 0,1% (m/v) azul de bromofenol, pH 6,8). Essa mistura foi mantida em água fervente por cinco minutos e transferida para o gelo até o momento da aplicação no gel. Os géis e sobre géis contiveram 12,5% e 6% de acrilamida:bis 37:1, respectivamente. Ao

final os mesmos foram corados com 1% (m/v) de azul de comassie diluído em 10% (v/v) ácido acético e 50% (v/v) etanol. Como padrão de peso molecular das proteínas foi utilizado o BenchMark Protein Ladder (Invitrogen®).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises moleculares geraram produtos de PCR com fragmentos de tamanho esperado, e permitiram verificar que, das 500 cepas analisadas, sete apresentaram genes *cyt*, destas, três contendo as duas classes de genes (*cyt1* e *cyt2*), e quatro, apenas uma delas. As figuras 1 e 2 mostram os perfis eletroforéticos das cepas utilizando os *primers* específicos para a classe de genes *cyt1* e *cyt2*, respectivamente. Os fragmentos amplificados foram confirmados via sequenciamento (Tabela 2).

Todas as cepas contendo a classe de genes *cyt1* apresentaram o gene *cyt1Aa*, destas apenas a cepa 257A apresentou também o gene *cyt1Ab*. Das cepas que contiveram a classe de genes *cyt2*, apenas a cepa P283 apresentou o gene *cyt2Ba*. As demais não apresentaram nenhum dos genes testados.

O sequenciamento dos fragmentos confirmou a identidade dos genes *cyt*. Nenhum polimorfismo foi observado entre as cepas avaliadas, confirmando a característica conservada dos genes em questão.

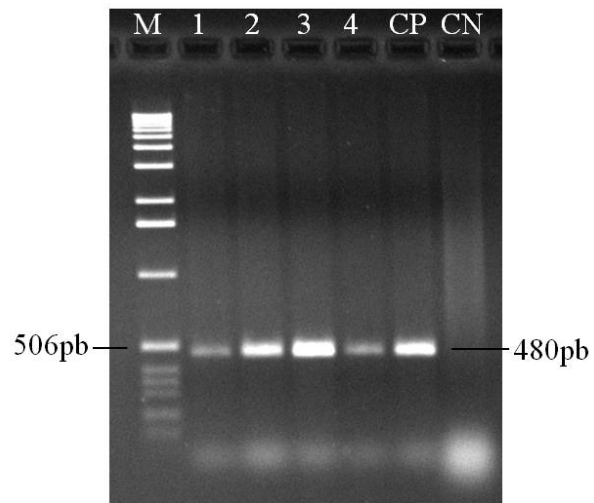


Figura 1 Produtos de PCR obtidos com os iniciadores específicos para a classe de genes *cyt1*. 1 – 257A, 2 – 1168C, 3 – 1646JAB, 4 – 1656JAB, CP – Controle positivo (*B. thuringiensis* subsp. *israelensis*) e CN – Controle negativo (HD1). M – Padrão de peso molecular (DNA Ladder 1Kb, Invitrogen®).

As cepas que apresentaram as duas classes de genes foram efetivas contra *S. frugiperda*, de acordo com Valicente et al. (2000), Valicente e Barreto (2003), Valicente e Fonseca (2004) e Valicente et al. (2010), duas com toxicidade de 100% (cepas 1646JAB e 1656JAB, provenientes de Jaboticabal – SP) e uma com 79,1% (cepa 1168C, proveniente de Jataí – GO). As demais apresentam 0% de toxicidade (cepas 257A, LT09, L7B8, P283, provenientes de Goiânia – GO, Paris – França, Limoeiro – AL e Goiânia – GO, respectivamente). A cepa 257A apresentou apenas a classe de genes *cyt1*, já as cepas LT09, L7B8 e P283, apresentaram apenas a classe *cyt2*.

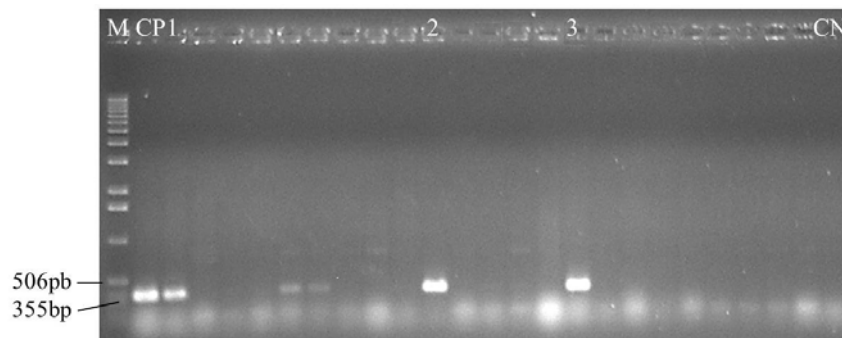


Figura 2 Produtos de PCR obtidos com os iniciadores específicos para a classe de genes *cyt2*. 1 – 1646JAB, 2 – P238, 3 – LT09, CP – Controle positivo (*B. thuringiensis* subsp. *israelensis*) e CN – Controle negativo (HD1). Poços sem identificação correspondem às cepas sem a classe de genes *cyt2*. M – Padrão de peso molecular (DNA Ladder 1Kb, Invitrogen®).

Dos nove pares de *primer* desenhados, quatro amplificaram fragmentos de tamanho esperado na cepa controle (*B. thuringiensis* subsp. *israelensis*), sendo validados via sequenciamento. Estes *primers* foram utilizados nas cepas que contiveram genes das classes *cyt1* e *cyt2*.

No presente trabalho, não foi possível relacionar a presença/ausência dos genes *cyt* com a toxicidade das cepas à *S. frugiperda*, já que estes foram presentes em cepas efetivas e não efetivas. Estes resultados são indícios da necessidade de novos estudos moleculares envolvendo expressão gênica, pois a técnica de PCR não permite avaliar se os genes estão sendo expressos, ou se há relações de antagonismo entre eles. A técnica fornece uma resposta rápida sobre a

presença/ausência de determinados genes, não podendo predizer a atividade inseticida dos isolados (BRAVO et al., 1998, p. 4966). Após a pré-seleção de cepas através de estudos de PCR, devem-se realizar bioensaios, e, desta maneira, selecionar as cepas mais eficientes para o grupo de insetos em estudo.

Tabela 2 Dados obtidos a partir da análise de BLAST dos fragmentos amplificados das cepas de *B. thuringiensis*, bem como do controle positivo (*B. thuringiensis* subsp. *israelensis* - Bti), utilizando os primers *cyt1*, *cyt2*, *cyt1Aa*, *cyt1Ab* e *cyt2Ba*.

Primer/Gene	Cepa	Nº de acesso	E value	Identidade máxima
<i>cyt 1</i>	Bti	DQ302752.2	0.0	99%
	257A	DQ302752.2	0.0	97%
	1168C	DQ302752.2	0.0	93%
	1646 JAB	DQ302752.2	0.0	98%
	1656 JAB	DQ302752.2	0.0	98%
<i>cyt 2</i>	Bti	DQ171939.2	2e-166	98%
	1168C	DQ171939.2	1e-138	93%
	1646 JAB	DQ171939.2	2e-155	97%
	1656 JAB	DQ171939.2	3e-159	97%
	LT09	DQ171939.2	2e-150	96%
	P283	GQ9190041.1	1e-137	94%
<i>cyt1Aa</i>	Bti	DQ200984.1	3e-62	91%
	257A	DQ200984.1	4e-65	89%
	1168C	DQ200984.1	2e-62	91%
	1646 JAB	DQ200984.1	4e-62	87%
	1656 JAB	DQ200984.1	2e-62	91%
<i>cyt1Ab</i>	Bti	X98793.1	4e-36	83%
	257A	X98793.1	1e-48	83%
<i>cyt2B*</i>	Bti	GQ919041.1	2e-22	86%
	Bti	AJ251979.1	1e-020	85%
<i>cyt2Ba</i>	Bti	CQ919041.1	9e-31	90%
	P283	CQ919041.1	4e-29	89%

No presente estudo, a porcentagem de amplificação para os genes *cyt* foi baixa. Dos 500 isolados analisados, apenas 7 (1,4%) amplificaram, pelo menos, uma das classes de genes *cyt*. Geralmente, a frequência de isolados contendo genes *cyt* (díptero-específicos) é baixa quando comparada à frequência de isolados lepidóptero-específicos, contendo genes da classe *cryI*. Resultado semelhante foi observado por Costa et al. (2010), estudando cepas da mesma coleção, entretanto, escolhidas aleatoriamente. Das 640 cepas analisadas pelos autores, nenhuma apresentou genes *cyt*, e apenas 1 (0,81%) apresentou amplificação para o gene *cry11Ba* (díptero-específico).

Poucos estudos têm sido feitos utilizando-se genes *cyt* na caracterização molecular de coleções de *B. thuringiensis*. Estes trabalhos visam associar a mortalidade ocasionada ao conteúdo de genes, levando ao conhecimento de novos isolados com potencial inseticida, promissores no controle biológico.

A maioria dos estudos envolvendo genes *cyt* aponta sua eficiência contra dípteros (BAYYAREDDY et al., 2009, p. 280), mostrando seu importante papel no controle biológico destes grupos. Entretanto, assim como no presente trabalho, genes *cyt* foram identificados em cepas de *B. thuringiensis* tóxicas a lepidópteros e coleópteros (GUERCHICOFF et al., 1997, 2001). Por exemplo, o gene *cyt2Ba* foi encontrado no *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis*, sendo este, efetivo contra coleópteros. Estes resultados mostram a necessidade de mais testes envolvendo outros grupos de insetos como lepidópteros, a fim de elucidar o real papel destes genes contra esse grupo e sua possível toxicidade.

Através da análise de SDS-PAGE realizada nas cepas que possuíam os genes *cyt* (Figura 3), vários padrões de proteínas puderam

ser observados além das proteínas Cyt (~27 kDa) (BUTKO, 2003, p. 2420), dentre eles, pesos moleculares correspondentes às proteínas Cry (40 kDa – 140 kDa) (BRAVO, 1997, p. 2793), responsáveis, assim como as Cyt, pela toxicidade do *B. thuringiensis* a insetos.

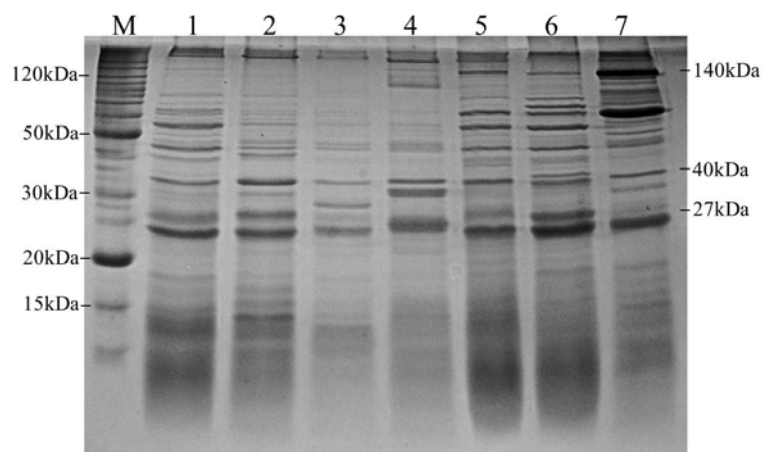


Figura 3 SDS-PAGE de cepas de *B. thuringiensis* contendo os genes *cyt*. 1 – P283, 2 – 257A, 3 – L7B8, 4 – LT09, 5 – 1168C, 6 – 1646 JAB e 7 – 1656JAB. M – Padrão de peso molecular BenchMark Protein Ladder (Invitrogen®).

Estudos apontam que as proteínas Cyt não possuem toxicidade isoladamente, agindo na membrana celular do intestino do inseto de forma sinérgica com as proteínas Cry, atuando como receptores adicionais destas, potencializando sua ação (OESTERGAARD et al. 2007, p. 3623). Esta sinergia Cyt/Cry é maior que as interações entre proteínas Cry. Wu et al. (1994) expressando várias combinações de genes Cyt/Cry, observou um incremento de quatro vezes na atividade tóxica das proteínas, em relação às proteínas Cry utilizadas isoladamente.

A presença conjunta de genes *cyt* e *cry* nas cepas utilizadas no presente estudo aponta uma fonte para novas investigações envolvendo sinergismo, como seu possível efeito contra *S. frugiperda* e outros lepidópteros.

4 CONCLUSÕES

Dos 500 isolados utilizados, 7 (1,4%) amplificaram pelo menos uma das classes de genes *cyt*, não sendo possível relacionar a presença/ausência dos genes *cyt* com a toxicidade das cepas à *S. frugiperda*, já que estes foram presentes em cepas efetivas e não efetivas.

Não foi possível relacionar o local de coleta das cepas com a presença/ausência dos genes *cyt*, bem como agrupá-las em sorotipos.

O estudo fornece dados para futuros trabalhos envolvendo expressão gênica e bioensaios, a fim de elucidar o papel destes genes em lepidópteros e sua possível toxicidade.

5 REFERÊNCIAS

BAYYAREDDY, K. et al. Proteomic identification of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* toxin Cry4Ba binding proteins in midgut membranes from *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* Linnaeus (Diptera, Culicidae) larvae. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Amsterdam, v. 39, n. 4, p. 279-286, apr. 2009.

BRAVO, A. Phylogenetic relationships of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin family proteins and their functional domains. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 179, n. 9, p. 2793-2801, may 1997.

BRAVO, A. Characterization of *cry* genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 12, p. 4965-4972, dec. 1998.

BUTKO, P. Cytolytic toxin Cyt1A and its mechanism of membrane damage: data and hypotheses. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 5, p. 2415-2422, may 2003.

CAROZZI, N. B. Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polimerase chain reaction product profiles. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, n. 11, p. 3057-3061, nov. 1991.

COSTA, J. R. V. et al. Atividade tóxica de isolados de *Bacillus thuringiensis* a larvas de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 39, n. 5, p. 757-766, set. 2010.

DELÉCLUSE, A.; JUÁREZ-PÉREZ, V.; BERRY, C. Vector-active toxins: structure and diversity. In: CHARLES, J. F. et al. (Ed.). **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application**. Dordrecht: Kluwer, 2000. p. 101-125.

GUERCHICOFF, A.; UGALDE, R. A.; RUBINSTEIN, C. P. Identification and characterization of a previously undescribed *cyt* gene in *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 7, p. 2716-2721, jul. 1997.

GUERCHICOFF, A.; DELECLUSE, A.; RUBINSTEIN, C. P. The *Bacillus thuringiensis cyt* genes for hemolytic endotoxins constitute a gene family. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 3, p. 1090-1096, mar. 2001.

IBARRA, J. et al. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Latin America with insecticidal activity against different mosquito species. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 9, p. 5269-5274, sept. 2003.

LERECLUS, D.; DELÉCLUSE, A. E.; LECADET, M. M. Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. In: ENWISTLE, P. F. et al. (Ed.). ***Bacillus thuringiensis, an environmental biopesticide: theory and practice***. West Sussex: John Willey e Sons, 1993. p. 37-69.

OESTERGAARD, J. et al. Binding of Cyt1Aa and Cry11Aa Toxins of *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* to brush border membrane vesicles of *Tipula paludosa* (Diptera: Nematocera) and subsequent pore formation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, n. 11, p. 3623-3629, jun. 2007.

PÉREZ, C. et al. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cry11Aa and Cyt1Aa toxins interactions support the synergism-model that Cyt1Aa functions as membrane bound receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 102, n. 51, p. 18303–18318, jun. 2005.

SILVA, R. B. **Caracterização molecular de *Bacillus thuringiensis* utilizando REP-PCR e perfil plasmidial**. 2009. 83 f. Dissertação

(Mestrado em Biotecnologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

VALICENTE, F. H.; BARRETO, M. R. *Bacillus thuringiensis* survey in Brazil: geographical distribution and insecticidal activity against *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology**, Piracicaba, v. 32, n. 4, p. 639-644, out. 2003.

VALICENTE, F. H.; FONSECA, M. M. Susceptibilidade da lagarta-do-cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda*, a diferentes isolados de *Bacillus thuringiensis*. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 3, n. 1, p. 21-29, mar. 2004.

VALICENTE, F. H. et al. Identificação através de PCR dos genes *cryI* de cepas de *Bacillus thuringiensis* Berliner eficientes contra a lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Piracicaba, v. 29, n. 1, p. 147-153, mar. 2000.

VALICENTE, F. H. et al. Molecular characterization and distribution of *Bacillus thuringiensis cryI* genes from Brazilian strains effective against the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. **Biological Control**, Amsterdam, v. 53, p. 360-366, feb. 2010.

VIDAL-QUIST, J. C.; CASTAÑERA, P.; GONZALES-CABRERA, J. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains isolated from citrus orchards in Spain and evaluation of their insecticidal activity against *Ceratitis capitata*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Seoul, v. 19, n. 8, p. 749-759, aug. 2009.

WU, D.; JOHNSON, J. J.; FEDERICI, B. A. Synergism of mosquitocidal toxicity between CytA and CryIVD proteins using inclusions produced from cloned genes of *Bacillus thuringiensis*. **Molecular Microbiology**, Malden, v. 13, n. 6, p. 965-972, sept. 1994.

CAPÍTULO 3

AValiação DA TOXICIDADE DE PROTEÍNAS INSETICIDAS A *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae)

RESUMO

A lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda*, é uma das principais pragas da cultura do milho, e seu controle é feito, em sua maioria, por inseticidas químicos. Diante disto, o *Bacillus thuringiensis* vem obtendo destaque como alternativa de controle biológico a estes compostos. O presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito das proteínas inseticidas Cry1Ba, Cry1Ca, Cry1Da e Cyt, sobre *S. frugiperda*, bem como avaliar se há atividade sinérgica entre elas. Para isso, foram feitos bioensaios com lagartas de *S. frugiperda* com dois dias de vida utilizando proteínas isoladas de clones recombinantes de *Escherichia coli* expressando os genes *cry1Ba*, *cry1Ca* e *cry1Da* e a cepa de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* como fonte de genes *cyt*. As proteínas foram isoladas, liofilizadas e eluídas em água destilada esterilizada. Foram utilizados 55 µl de proteína em cubos de dieta artificial presentes em copos de 50 mL, sendo adicionada uma lagarta por copo. Os tratamentos foram compostos por 4 repetições de 12 lagartas cada. Após 5 dias de exposição das lagartas às toxinas, foram avaliados os pesos e porcentagem de mortalidade. Os dados foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis a 5% de significância. Além disso, foram confeccionados gráficos de médias e erros-padrão dos tratamentos. Apenas a proteína Cry1Ca foi efetiva contra os indivíduos avaliados, apresentando mortalidade de 77,08%. A utilização do indutor de expressão IPTG aumentou a mortalidade das lagartas apenas quando associado à ativação das proteínas com tripsina. Em relação ao desenvolvimento das lagartas, apenas nos tratamentos Cry1BaSc e Cry1BaCC não houve diferença significativa em relação à testemunha. Os menores pesos foram observados em todos os tratamentos utilizando a toxina Cry1Ca. Não foi observado sinergismo positivo entre as proteínas avaliadas, havendo redução na mortalidade em relação às proteínas utilizadas isoladamente. O presente estudo serve como fonte para futuras abordagens envolvendo bioensaios e sinergismo.

Palavras-chave: bactérias entomopatogênicas, controle biológico, proteínas Cyt, proteínas Cry, lagarta-do-cartucho.

**ASSESSMENT OF TOXICITY ACTIVITY OF INSECTICIDAL
PROTEINS AGAINST *Spodoptera frugiperda*(J.E. Smith)
(Lepidoptera: Noctuidae)**

ABSTRACT

The fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, is a major maize pest and is controlled mostly by chemical insecticides. Given this, the *Bacillus thuringiensis* has been gaining prominence as an alternative biological control with these compounds. This study was aimed to evaluate the effect of insecticidal proteins Cry1Ba, Cry1Ca, Cry1Da and Cyt against *S. frugiperda*, and to assess whether there is synergistic activity between them. For this reason, bioassays were performed with larvae of *S. frugiperda* with two days of life using proteins isolated from recombinant clones of *Escherichia coli* expressing *cry1Ba*, *cry1Ca* and *cry1Da* genes and *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* strain as a source of genes *cyt*. The proteins were isolated, lyophilized and eluted in sterile water. 55 µl of protein was used on artificial diet cubes present in vessels of 50 mL, was placed one armyworm per vessel. The treatments were four replicates of 12 larvae each. After 5 days of exposure of the larvae to the toxins, we assessed weights and mortality. The data were submitted to Kruskal-Wallis test at 5% significance. Additionally, we made plots of means and standard errors of the treatments. Just Cry1Ca protein was effective against the tested individuals, with a mortality rate of 77.08%. The use of the expression inducer IPTG increased the mortality of the larvae only when associated with activation of the protein with trypsin. Regarding the development of the larvae, only the treatments Cry1BaSc and Cry1BaCC showed no significant difference compared to control. The lowest weights were observed in all treatments using the toxin Cry1Ca. Positive synergism was not observed between the proteins evaluated, with reduction in mortality when compared with the individual use of each protein alone. This study serves as a source for future approaches involving bioassays and synergism.

Keywords: entomopathogenic bacteria, biological control, Cyt proteins, Cry proteins, the armyworms.

1 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é o terceiro cereal mais cultivado no mundo, perdendo apenas para o trigo e o arroz, sendo o primeiro no Brasil, com cerca de 51.382,9 milhões de toneladas de grãos produzidos, em uma área de aproximadamente 12.896,8 milhões de hectares, tornando o país o terceiro maior produtor do grão no mundo, atrás apenas dos Estados Unidos e China, respectivamente (CONAB, 2010).

Um dos fatores que comprometem o rendimento e a qualidade da produção do milho é a incidência de pragas, como a lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda*, uma das principais pragas da cultura no Brasil e em alguns países da América do Sul e Central, não somente pelos danos provocados, mas especialmente pela dificuldade no seu controle, que é feito, em sua maioria, por inseticidas químicos. Entretanto, a utilização abusiva desses produtos desencadeia vários problemas, que vão desde a falta de especificidade a contaminação ao meio ambiente.

Diante disto, o controle biológico vem obtendo destaque nos últimos anos como alternativa a estes compostos. Neste cenário, destaca-se a bactéria *Bacillus thuringiensis* que possui atividade tóxica contra diferentes ordens de insetos, incluindo Coleoptera, Diptera, Lepidoptera, Homoptera, Hymenoptera, dentre outras, além de alguns ácaros, nematóides e platelmintos (FEITELSON, 1992, p. 63). Esta propriedade deve-se à produção de diferentes proteínas como as quitinases, proteases, exotoxinas (Vip), endotoxinas (Cry e Cyt), dentre outras, sendo as últimas, formadoras de cristais (SCHNEPF; WHITELEY, 1985). O espectro de ação do *B. thuringiensis* é explicado pelos diferentes tipos e proporções de proteínas presentes nestes cristais.

Devido a estes fatores, o *B. thuringiensis* é o principal agente de controle biológico utilizado atualmente, representando cerca de 90% dos biopesticidas, além de possuir seus genes incorporados a diversos transgênicos (POLANCZYK; ALVES, 2003, p. 1).

Vários trabalhos vêm sendo feitos a fim de avaliar a eficiência do *B. thuringiensis* contra a *S. frugiperda*. Valicente et al. (2000), Valicente e Barreto (2003) e Valicente e Fonseca (2004), analisando o efeito do *B. thuringiensis* nas lagartas de *S. frugiperda*, obtiveram resultados de mortalidade de até 100%. Resultados semelhantes foram observados por Fatoreto et al. (2007), onde cerca de 35% dos isolados de *B. thuringiensis* promoveram 100% de mortalidade nas lagartas. Estes resultados apontam o *B. thuringiensis* como alternativa viável para o controle da *S. frugiperda*, evitando a contaminação do meio ambiente e do homem, além de preservar os inimigos naturais. Entretanto, é necessária a constante busca por novas cepas eficientes, que possam ser úteis no manejo da resistência de pragas a estas toxinas.

Desse modo, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito das proteínas inseticidas Cry1Ba, Cry1Ca, Cry1Da e Cyt, sobre *S. frugiperda*, bem como se há atividade sinérgica entre elas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Extração e purificação de proteínas Cry e Cyt

Para o estudo de toxicidade e sinergismo entre as proteínas Cry e Cyt, foram utilizados clones recombinantes de *Escherichia coli* provenientes do *Bacillus Stock Center* (The Ohio State University, USA), expressando os genes *cry1Ba* (BGSC N° ECE128), *cry1Ca* (BGSC N° ECE125) e *cry1Da* (BGSC N° ECE129), e a cepa de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, proveniente da Unesp – Jaboticabal/SP, como fonte de genes *cyt*.

As proteínas foram isoladas segundo Valicente et al. (2010), com algumas modificações. As bactérias cresceram em placas contendo meio LB sólido por 16 horas a 37°C (*E. coli*) e a 28°C (*B. thuringiensis* subsp. *israelensis*). Em seguida, metade de cada placa foi raspada e adicionada a 200 mL de meio LB contendo 100 µg/mL de ampicilina (apenas para os clones de *E. coli*), utilizando *erlenmeyers* de 500 mL. As bactérias cresceram em *shaker* a 150 rpm a 37°C por 72 horas. Em metade dos tratamentos, foi adicionado 1 mM IPTG. Em seguida, as culturas foram centrifugadas a 10000 rpm por 10 minutos, sendo o sobrenadante descartado e o *pellet* ressuscitado em 15 mL 0.01% Triton. Esta etapa foi repetida três vezes. Após essa lavagem, o *pellet* foi solubilizado utilizando 10 mL do tampão (0.01% Triton, 10 mM NaCl e 50 mM Tris-HCl, pH 8.0). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10000 rpm por 10 minutos, e o *pellet* ressuscitado em 10 mL do tampão (50mM bicarbonato de sódio e 10mM β-mercapetanol, pH 10.5) e mantido em *shaker* a 37°C por três horas. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 10000 rpm por 10 minutos. Em seguida,

o *pellet* foi ressuscitado em 5 mL de 0.1 M Tris pH 8.0. Ao final da extração, a proteína foi ativada utilizando tripsina ($0,5\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$), apenas na metade dos tratamentos. A solução foi mantida em *shaker* a 150 rpm a 37°C por duas horas. Ao final, a reação foi inativada utilizando 0,15 mM PMSF (Fenil metil sulfonil fluorido). Após esta etapa, as proteínas foram liofilizadas, pesadas e eluídas em água destilada e mantidas nas concentrações de 50 e 100 mg/mL.

Para a confirmação da expressão das proteínas, após a extração, foi feita a observação dos cristais ao microscópio óptico.

2.2 Criação de *S. frugiperda*

A criação de *S. frugiperda* foi realizada no Laboratório de Controle Biológico da Embrapa Milho e Sorgo (CNPMS). Os insetos foram criados em BOD sob as condições de 25°C , UR 70% e fotofase de 14 horas de luz, alimentados com dieta artificial modificada por Valicente e Barreto (1999), contendo os seguintes componentes por litro de dieta: grãos de feijão cozido (123,6 g), gérmen de trigo (59,3 g), levedo de cerveja (38,0 g), ácido ascórbico (3,82 g), nipagin (2,36 g), ácido sórbico (1,23 g), ágar (15,35 g), formaldeído (3,1 g), ácido fosfórico (0,131 ml) e ácido propiônico (1,3 ml).

2.3 Bioensaios

Os bioensaios foram realizados com lagartas de *S. frugiperda* com dois dias de vida. Foram utilizadas 48 lagartas por tratamento, com 4 repetições de 12 lagartas cada. As avaliações de mortalidade e peso foram realizadas no quinto dia após a exposição da larva à dieta tratada.

Realizou-se, também, um controle negativo (testemunha), no qual foi adicionada apenas água destilada esterilizada e Tween 20 à dieta.

Foram realizados dois experimentos, o primeiro visou avaliar o efeito das proteínas Cry isoladamente sobre *S. frugiperda* e selecionar a metodologia mais eficiente no tratamento destas proteínas. Os tratamentos foram compostos pelas seguintes metodologias utilizadas durante o crescimento dos clones de *E. coli* e extração das proteínas: proteínas ativadas com a protease tripsina e clones crescidos em meio contendo o indutor de expressão IPTG (CC), proteínas sem tripsina e clones com IPTG (SC), proteínas com tripsina e clones sem IPTG (CS), e proteínas sem tripsina e clones sem IPTG (SS).

O segundo experimento objetivou avaliar o efeito sinérgico das proteínas Cry e Cyt. Para tanto, foi escolhida a metodologia do primeiro experimento onde foi observada a maior taxa de mortalidade, ou seja, todas as proteínas foram tratadas com tripsina e os clones crescidos em meio contendo IPTG. Nos tratamentos contendo as duas proteínas Cry:Cry e Cyt:Cry foi utilizada a concentração de 50 mg de cada proteína nas seguintes proporções: Cry:Cry (1:1) e Cyt:Cry (1:1 e 1:3).

Em ambos os experimentos, foi utilizada uma alta dose de proteína (100 mg/mL). No experimento de sinergismo, além da dose de 100 mg/mL foi utilizada a dose de 50 mg/mL. Foram adicionados 55 µl de proteína eluída em água destilada esterilizada contendo uma gota de Tween 20 a cubos de dieta artificial (~1,2 g de dieta) presentes em copos de 50 mL, sendo estes armazenados à temperatura ambiente por 120 minutos. Após este período, as lagartas foram individualmente colocadas em copos contendo a dieta artificial. Em seguida, os copos foram transferidos para a sala de criação sob as condições de 27°C, UR

68% e fotofase de 14 horas de luz, onde permaneceram durante todo o experimento.

2.4 Análise estatística

As avaliações dos parâmetros mortalidade, em porcentagem, e peso das lagartas, em miligramas, foram realizadas 5 dias após a exposição das mesmas à dieta tratada.

As pressuposições de normalidade dos erros e homogeneidade de variância foram testadas pelos procedimentos UNIVARIATE e GLM. Como os dados não se ajustaram à normalidade dos erros pelo teste de Levene a $p \leq 0,05$, as médias dos tratamentos foram submetidas a testes não paramétricos. Para tanto, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis a 5% de significância pelo procedimento NPAIRWAY do SAS versão 9.2 (SAS INSTITUTE, 2002). Além disto, foram confeccionados gráficos de médias e erros-padrão dos tratamentos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados de mortalidade das lagartas de *S. frugiperda* revelaram que apenas a proteína Cry1Ca foi efetiva contra os indivíduos avaliados, apresentando mortalidade de 77,08% (Figura 1 e Tabela 1). As demais toxinas apresentaram baixa atividade tóxica, com valores inferiores a 8,3% de mortalidade. O tratamento mais eficiente foi Cry1CaCC (Com ativação por tripsina e adição de IPTG), seguido do tratamento Cry1CaCS (Com tripsina e sem adição de IPTG), que apresentou 41,67% de mortalidade. Já os tratamentos Cry1BaSC, Cry1BaCC e Cry1DaSC não apresentaram toxicidade (Tabela 1 e Figura 1).

Tabela 1 Médias e erros-padrão dos pesos e mortalidades das lagartas de *S. frugiperda* submetidas às toxinas de *B. thuringiensis*. SS – Sem tripsina e sem IPTG, SC – Sem tripsina e com IPTG, CS – Com tripsina e sem IPTG e CC – Com tripsina e com IPTG.

Tratamentos	Médias \pm erros-padrão a $p \leq 0,05$	
	Peso de lagartas	Mortalidade (%)
Água	11,39 \pm 0,34 a	0,00 \pm 0,00 a
Cry1BaSC	11,85 \pm 0,23 ab	0,00 \pm 0,00 a
Cry1BaCC	11,08 \pm 0,64 ab	0,00 \pm 0,00 a
Cry1BaSS	9,12 \pm 0,38 bc	2,08 \pm 2,08 a
Cry1BaCS	9,11 \pm 0,57 bc	8,33 \pm 3,40 b
Cry1DaSC	9,92 \pm 0,54 bc	0,00 \pm 0,00 a
Cry1DaCC	9,51 \pm 0,44 bc	2,08 \pm 2,08 a
Cry1DaCS	8,26 \pm 0,59 c	2,08 \pm 2,08 a
Cry1DaSS	7,76 \pm 0,56 c	4,17 \pm 4,17 a
Cry1CaSS	3,43 \pm 0,25 d	18,75 \pm 3,99 bc
Cry1CaSC	2,55 \pm 0,36 de	18,75 \pm 9,24 bc
Cry1CaCS	2,08 \pm 0,36 e	41,67 \pm 10,21 cd
Cry1CaCC	0,62 \pm 0,23 f	77,08 \pm 11,47 d

As médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis a $p \leq 0,05$.

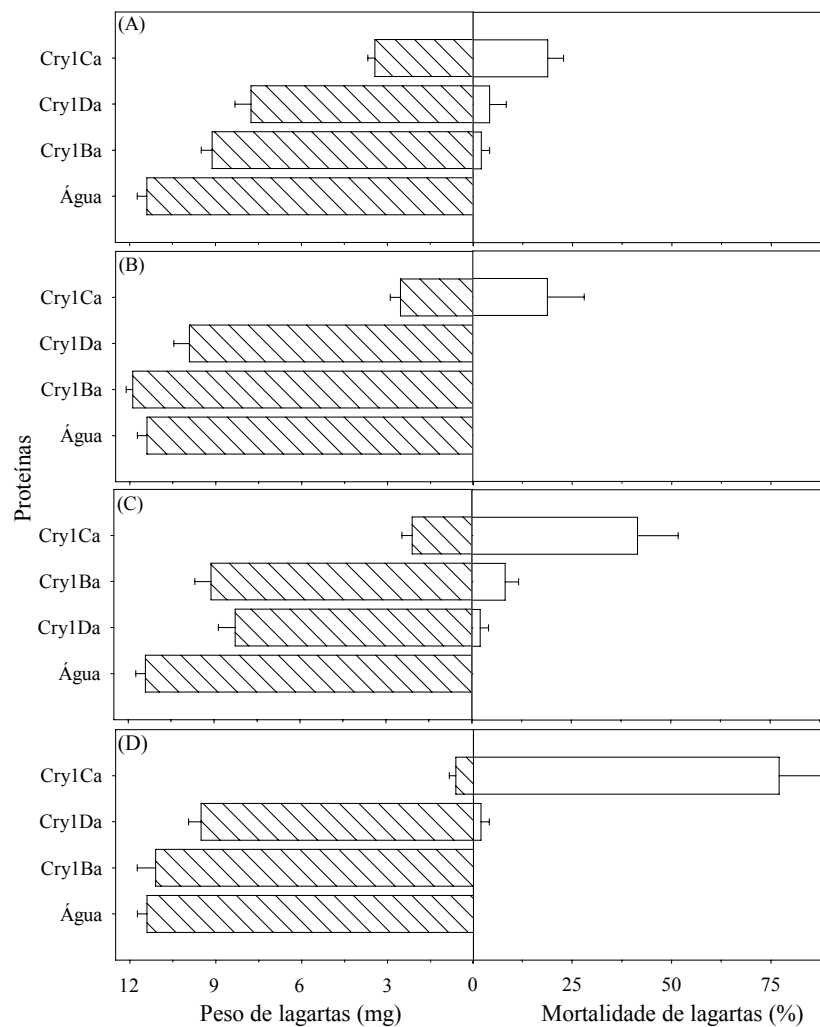


Figura 1 Peso e mortalidade de lagartas de *S. frugiperda* submetidas às toxinas Cry de *B. thuringiensis*. A – Proteínas sem tratamento com tripsina e clones crescidos em meio sem IPTG, B – Sem tripsina e com IPTG, C- Com tripsina e sem IPTG e D – Com tripsina e com IPTG.

Vários trabalhos relatam a eficiência das proteínas da classe Cry1 contra lagartas de lepidópteros (BRAVO et al., 2007). Rodríguez-Cabrera et al. (2008), demonstram as interações bioquímicas da ligação toxina-receptor de proteínas Cry1Ac à membrana do intestino médio de lagartas de *S. frugiperda*, gerando alta toxicidade. Santos et al. (2009), obtiveram os maiores valores de mortalidade contra *S. frugiperda* utilizando as proteínas Cry1Aa e Cry1Ab. López-Pazos et al. (2010) relataram uma baixa toxicidade da toxina Cry1Ba a lagartas de lepidópteros, assim como observado no presente estudo. Já Hernández-Martínez et al. (2008) obtiveram alta toxicidade com a proteína Cry1Da contra *Spodoptera exigua*, o que não foi observado no presente trabalho para *S. frugiperda*. Isto pode estar relacionado a características intrínsecas e variabilidade genética de cada espécie.

A utilização do indutor de expressão IPTG no crescimento dos clones aumentou a mortalidade das lagartas apenas quando associado à ativação das proteínas com tripsina. Sem a utilização de tripsina, a mortalidade das lagartas de *S. frugiperda* utilizando a toxina Cry1Ca foi de 18,75%, com ou sem a utilização de IPTG. Já com a adição de tripsina, os valores de mortalidade aumentaram para 41,67%, sem a adição conjunta do IPTG e para 77,08% com a adição do IPTG. Estes dados revelam a importância já relatada da ativação destas proteínas para incremento da toxicidade das mesmas. Para as proteínas Cry1Ba e Cry1Da, que apresentaram baixa toxicidade, os tratamentos com tripsina e IPTG não apresentaram relação com a toxicidade.

Em relação ao desenvolvimento das lagartas, apenas nos tratamentos Cry1BaSC e Cry1BaCC não houve diferença significativa a $p \leq 0,05$ de probabilidade em relação à testemunha. Nos demais tratamentos houve efeito no desenvolvimento larval, causando redução

no peso médio das lagartas. Os menores pesos foram observados em todos os tratamentos utilizando a toxina Cry1Ca, valores de 0,62 a 3,43 mg, contra 11,39 mg da testemunha, confirmando a alta eficiência destas proteínas. Apesar de todos os tratamentos contendo a toxina Cry1Da e os tratamentos Cry1BaSS e Cry1BaCS não terem apresentado alta taxa de mortalidade, houve diminuição no peso médio das lagartas.

No segundo experimento, o tratamento mais eficiente foi o Cry1Ca (100mg) com 77,08% de mortalidade contra *S. frugiperda*. Apenas os tratamentos contendo esta toxina diferiram estatisticamente da testemunha nas duas variáveis analisadas (Tabela 2 e Figura 2).

Tabela 2 Médias e erros-padrão dos pesos e mortalidades das lagartas de *S. frugiperda* submetidas às toxinas de *B. thuringiensis*.

Tratamentos	Médias ± erros-padrão a $p \leq 0,05$	
	Peso de lagartas	Mortalidade (%)
Água	12,39 ± 0,19 a	0,00 ± 0,00 a
Cyt (50mg)	12,42 ± 0,10 a	0,00 ± 0,00 a
Cyt (100mg)	13,10 ± 0,30 a	0,00 ± 0,00 a
Cry1Ba (50mg)	12,65 ± 0,10 a	0,00 ± 0,00 a
Cry1Ba (100mg)	12,08 ± 0,28 a	0,00 ± 0,00 a
Cry1Da (50mg)	12,41 ± 0,10 a	0,00 ± 0,00 a
Cry1Da (100mg)	11,35 ± 0,27 a	0,00 ± 0,00 a
Cyt+Cry1Ba (50mg:50mg)	13,82 ± 0,89 a	0,00 ± 0,00 a
Cyt+Cry1Ba (50mg:150mg)	13,37 ± 0,43 a	0,00 ± 0,00 a
Cyt+1Cry1Da (50mg:50mg)	13,33 ± 0,35 a	0,00 ± 0,00 a
Cyt+1Cry1Da (50mg:150mg)	13,79 ± 0,26 a	0,00 ± 0,00 a
Cry1Ba+Cry1Da (50mg:50mg)	13,11 ± 0,19 a	0,00 ± 0,00 a
Cyt+Cry1Ca (50mg:50mg)	3,21 ± 0,26 b	22,92 ± 5,33 b
Cyt+Cry1Ca (50mg:150mg)	2,26 ± 0,29 b	22,92 ± 5,68 b
Cry1Ca+Cry1Da (50mg:50mg)	2,62 ± 0,09b	56,25 ± 2,30 c
Cry1Ca+Cry1Ba (50mg:50mg)	2,58 ± 0,20b	70,83 ± 3,11 d
Cry1Ca (50mg)	2,16 ± 0,48 b	75,00 ± 5,89 d
Cry1Ca (100mg)	2,13 ± 0,25 b	77,08 ± 2,30 d

As médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis a $p \leq 0,05$.

O tratamento Cry1Ca+Cry1Ba (50mg:50mg) apresentou valor de mortalidade semelhante à toxina Cry1Ca isoladamente, com valor de 70,83% (Tabela 2). Já os tratamentos Cry1Ca+Cry1Da (50mg:50mg), Cyt+Cry1Ca (50mg:150mg) e Cyt+Cry1Ca (50mg:50mg), diferiram da testemunha, entretanto com redução significativa da mortalidade, com valores de 56,25%, 22,92% e 22,92%, respectivamente. Estes valores são inferiores ao tratamento Cry1Ca (50mg), indicando que não houve efeito de diluição, podendo ter ocorrido um sinergismo negativo entre estas proteínas. Os demais tratamentos não apresentaram mortalidade e o peso das lagartas não diferiu estatisticamente da testemunha.

Não houve incremento da toxicidade através da utilização conjunta de proteínas Cyt e Cry utilizadas no presente estudo. Estudos mostram que as proteínas Cry ligam-se a receptores específicos presentes da membrana do intestino médio dos insetos-alvo, já as proteínas Cyt não apresentam essa interação proteína-receptor, ligando-se diretamente às células da membrana, atuando de maneira sinérgica com as proteínas Cry, servindo como receptores adicionais destas (OESTERGAARD et al., 2007, p. 3623). Estudos relatam que há sinergismo entre as proteínas Cry e Cyt1A de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* produzindo um alto nível de toxicidade contra insetos-alvo (CRICKMORE et al., 1995, p. 250 ; WIRTH et al., 2000, p. 1093). Promdonkoy et al. (2005) avaliando o efeito sinérgico das proteínas Cry4Ba e Cyt2Aa2 em clones recombinantes de *E. coli* expressando ambas as proteínas, demonstraram que houve um incremento na atividade tóxica quando utilizadas as proteínas em conjunto.

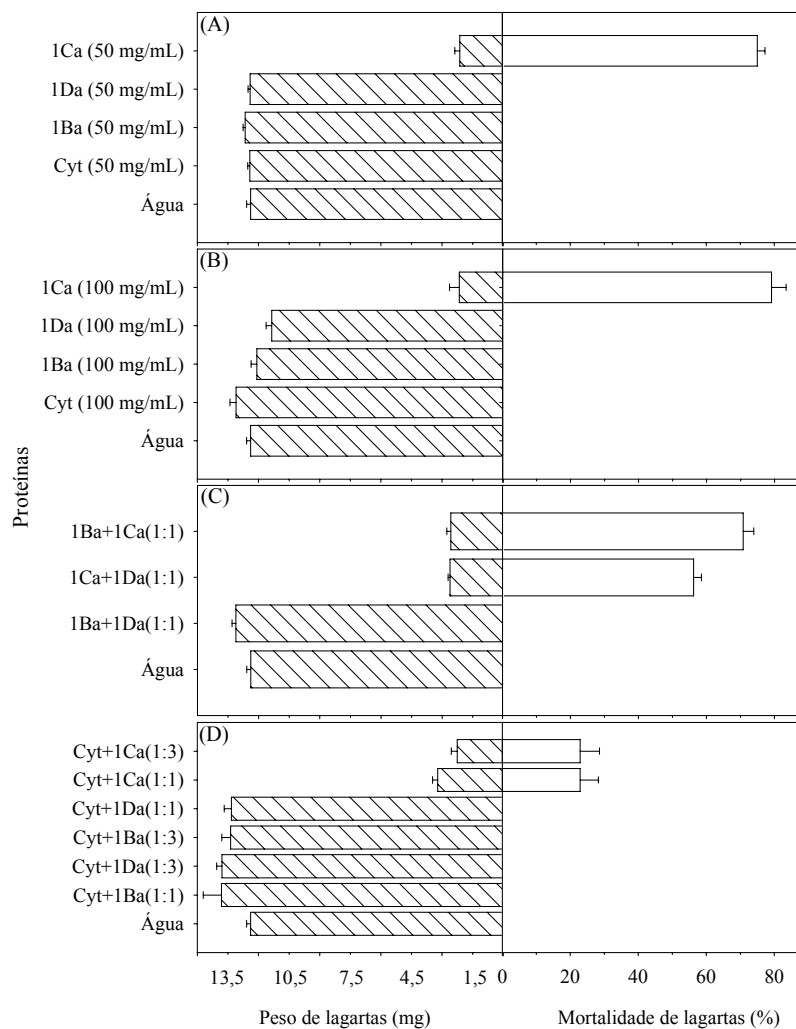


Figura 2 Peso e mortalidade de lagartas de *S. frugiperda* submetidas às toxinas de *B. thuringiensis*. A – Tratamento contendo 50 mg/mL de toxina. B – Tratamento contendo 100 mg/mL de toxina, C- Tratamento contendo as misturas de toxinas Cry na proporção 1:1 (50mg:50mg) e D – Tratamento contendo misturas de toxinas Cyt e Cry nas proporções 1:1 (50mg:50mg) e 1:3 (50mg:150mg).

Não foi observado sinergismo entre as proteínas estudadas contra *S. frugiperda* no atual trabalho, havendo a necessidade do uso de novas combinações de proteínas em futuros estudos. O uso de sinergismo pode levar à redução na quantidade de *B. thuringiensis* necessária ao controle de insetos-praga, além de aumentar o espectro de ação e reduzir a evolução da resistência destes insetos (GEORGHIU; SAITO, 1983, p. 270; LIU; TABASHNIK, 1997, p. 287).

Apesar de alguns tratamentos demonstrarem baixa toxicidade, na maioria deles, houve diminuição no peso das lagartas de *S. frugiperda*, podendo acarretar em problemas no desenvolvimento destes indivíduos.

4 CONCLUSÕES

A proteína Cry1Ca apresentou a maior toxicidade contra os indivíduos avaliados, apresentando mortalidade de 77,08%. As demais apresentaram baixa atividade tóxica, com valores inferiores a 8,3% de mortalidade.

A utilização do indutor de expressão IPTG aumentou a mortalidade das lagartas apenas quando associado à ativação das proteínas com tripsina.

Em relação desenvolvimento larval, houve redução no peso médio das lagartas em todos os tratamentos, exceto em Cry1BaSC e Cry1BaCC.

Os menores pesos de lagartas foram observados em todos os tratamentos utilizando a toxina Cry1Ca, valores de 0,62 a 3,43 mg, contra 11,39 mg da testemunha, confirmando a alta eficiência destas proteínas.

O tratamento Cry1Ca+Cry1Ba (50mg:50mg) apresentou valor de mortalidade semelhante à toxina Cry1Ca isoladamente, com valor de 70,83%.

Nos tratamentos Cry1Ca+Cry1Da (50mg:50mg), Cyt+Cry1Ca (50mg:150mg) e Cyt+Cry1Ca (50mg:50mg) houve redução significativa da mortalidade em relação à utilização da proteína Cry1Ca isoladamente, com valores de 56,25%, 22,92% e 22,92%, respectivamente.

Não houve incremento da toxicidade através da utilização conjunta das proteínas Cry e Cyt utilizadas no presente estudo contra *S. frugiperda*.

3 REFERÊNCIAS

- BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, Cuernavaca, v. 49, p. 423-435, mar. 2007.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. CONAB. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos, sexto levantamento**. Brasília, 2010. 42 p.
- CRICKMORE, N. et al. Contribution of the individual components of the d-endotoxin crystal to the mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **FEMS Microbiology Letters**, Delft, v. 131, n. 3, p. 249-254, jul. 1995.
- FATORETTO, J. C. et al. Associação de bioensaios e caracterização molecular para seleção de novos isolados de *Bacillus thuringiensis* efetivos contra *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology**, Piracicaba, v. 36, n. 5, p. 737-745, out. 2007.
- FEITELSON, J. S. The *Bacillus thuringiensis* family tree. In: KIM, L. (Ed.). **Advanced engineered pesticides**. New York: Marcel Dekker, 1992. p. 63-71.
- GEORGHIOU, G. P. Management of resistance in arthropods. In: GEORGHIOU, G. P.; SAITO, T. (Ed.). **Pest resistance to pesticides**. New York: Plenum, 1983. p. 769-792.
- HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, P.; FERRÉ, J.; ESCRICHE, B. Susceptibility of *Spodoptera exigua* to 9 toxins from *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, California, v. 97, p. 245-250, jan. 2008.

LIU, Y. B.; TABASHNIK, B. E. Synergism of *Bacillus thuringiensis* by ethylenediamine tetraacetate in susceptible and resistant larvae of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). **Journal of Economic Entomology**, Washington, v. 90, n. 2, p. 287-292, apr. 1997.

LÓPEZ-PAZOS, S. A. et al. Activity of *Bacillus thuringiensis* hybrid protein against a lepidopteran and a coleopteran pest. **FEMS Microbiology Letters**, Delft, v. 302, p. 93-98, jan. 2010.

OESTERGAARD, J. et al. Binding of Cyt1Aa and Cry11Aa Toxins of *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* to brush border membrane vesicles of *Tipula paludosa* (Diptera: Nematocera) and subsequent pore formation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, n. 11, p. 3623-3629, jun. 2007.

POLANCZYK, R.; ALVES, S. B. *Bacillus thuringiensis*: uma breve revisão. **Agrociencia**, Texcoco, v. 7, n. 2, p. 1-10, sept. 2003.

PROMDONKOY, B.; PROMDONKOY, P.; PANYIM, S. Co-expression of *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba and Cyt2Aa2 in *Escherichia coli* revealed high synergism against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* larvae. **FEMS Microbiology Letters**, Delft, v. 252, p. 121-126, sept. 2005.

RODRÍGUEZ-CABRERA, L. et al. Molecular characterization of *Spodoptera frugiperda*-*Bacillus thuringiensis* Cry1Ca toxin interaction. **Toxicon**, Cuernavaca, v. 51, n. 4, p. 681-692, dec. 2008.

SANTOS, K. B. et al. Selection and characterization of the *Bacillus thuringiensis* strains toxic to *Spodoptera eridania* (Cramer), *Spodoptera cosmioides* (Walker) and *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Biological Control**, Amsterdam, v. 50, n. 2, p. 157-163, apr. 2009.

SAS. **PROC user's manual version 9.2**. 6. ed. Cary: NC, 2002.

SCHNEPF, H. E.; WHITELEY, H. R. Protein toxins of *Bacilli*. In: HOCH, J. A.; SETLOW, Y. (Ed.). **Molecular biology of microbial differentiation**. Washington: American Society for Microbiology, 1985. p. 209-216.

VALICENTE, F. H. et al. Molecular characterization and distribution of *Bacillus thuringiensis cryI* genes from Brazilian strains effective against the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. **Biological Control**, Amsterdam, v. 53, p. 360-366, feb. 2010.

VALICENTE, F. H.; BARRETO, M. R. Levantamento dos inimigos naturais da lagarta do cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), na região de Cascavel, PR. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 28, n. 2, p. 333-337, jun. 1999.

VALICENTE, F. H.; BARRETO, M. R. *Bacillus thuringiensis* survey in Brazil: geographical distribution and insecticidal activity against *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology**, Piracicaba, v. 32, n. 4, p. 639-644, out. 2003.

VALICENTE, F. H.; FONSECA, M. M. Susceptibilidade da lagarta-do-cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda*, a diferentes isolados de *Bacillus thuringiensis*. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 3, n. 1, p. 21-29, dez. 2004.

VALICENTE, F. H. et al. Identificação através de PCR dos genes *cryI* de cepas de *Bacillus thuringiensis* Berliner eficientes contra a lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Piracicaba, v. 29, n. 1, p. 147-153, mar. 2000.

WIRTH, M. C.; FEDERICI, B. A.; WALTON, W. E. Cyt1A from *Bacillus thuringiensis* synergizes activity of *Bacillus sphaericus*

against *Aedes aegypti*. **Applied and Environmental Microbiology**,
Washington, v. 66, n. 3, p. 1093-1097, mar. 2000.