

## Estudo da variabilidade gênica em isolados brasileiros de *Bacillus thuringiensis* para emprego no controle biológico de *Plutella xylostella*

A. M. G. THULER, R. T. THULER, E. S. CÍCERO, S. A. DE BORTOLI, M. V. F. LEMOS

O objetivo deste trabalho foi demonstrar diferenças no conteúdo de genes *cry* de isolados mais recentes de *Bacillus thuringiensis* em relação à linhagem HD1, amplamente utilizada na formulação de produtos comerciais, bem como avaliar o efeito das mesmas sobre uma população de *Plutella xylostella*, suscetível à bactéria. Os isolados BR<sub>5</sub>, BR<sub>6</sub>, BR<sub>11</sub>, BR<sub>12</sub>, BR<sub>16</sub>, BR<sub>17</sub>, BR<sub>18</sub>, BR<sub>21</sub>, BR<sub>37</sub>, BR<sub>49</sub>, BR<sub>54</sub>, BR<sub>75</sub>, BR<sub>78</sub>, BR<sub>80</sub> e BR<sub>90</sub>; além do isolado HD1 e o controle negativo *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* utilizados neste estudo, fazem parte da coleção do Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA) da FCAV-UNESP/Jaboticabal-SP. Para realização do trabalho foram feitas reações de PCR utilizando-se os iniciadores específicos para *cry*IAa, *cry*IAc, *cry*IB, *cry*IC e *cry*IF. Pelas reações de PCR foram observadas as seguintes ampliações: HD1 - *cry*IAa e B; BR<sub>05</sub> - *cry*IF; BR<sub>06</sub> - *cry*IAa, B e Ac; BR<sub>11</sub> - *cry*IB e Ac; BR<sub>12</sub> - *cry*IAa, B e F; BR<sub>16</sub> - *cry*IB e Ac; BR<sub>17</sub> - *cry*IAa, Ac e F; BR<sub>18</sub> - *cry*IB e Ac; BR<sub>21</sub> - *cry*IB e Ac; BR<sub>37</sub> - *cry*IAa, B e F; BR<sub>49</sub> - *cry*IB; BR<sub>54</sub> - *cry*IB, Ac e C; BR<sub>75</sub> - *cry*IAa, B, C e F; BR<sub>78</sub> - *cry*IB, Ac e F; BR<sub>80</sub> - *cry*IAa, B e C e BR<sub>90</sub> - *cry*IB e F. Nos bioensaios observou-se 100% de mortalidade para lagartas de *P. xylostella* com os isolados utilizados, excetuando-se o isolado BR<sub>05</sub> que causou 98%, indicando assim que para uma população suscetível deste inseto, como a utilizada no estudo, a efetividade da bactéria *B. thuringiensis* independe do conteúdo de genes *cry* de cada isolado. No entanto, sugere-se que esses isolados que apresentaram perfis diferenciados em relação aos genes *cry* estudados, possam ser empregados na formulação de novos bioformulados, para manejar a resistência em casos em que os receptores de membrana sejam diferenciados dos apresentados por insetos resistentes a isolados como HD-1, comumente encontrado em formulações comerciais.

A. M. GUIDELLI THULER, [guidelli@fcav.unesp.br](mailto:guidelli@fcav.unesp.br); R. T. THULER, [rthuler@fcav.unesp.br](mailto:rthuler@fcav.unesp.br); E. SILVA CÍCERO, [elcicero@fcav.unesp.br](mailto:elcicero@fcav.unesp.br); S. A. DE BORTOLI, [bortoli@fcav.unesp.br](mailto:bortoli@fcav.unesp.br); M. V. FRANCO LEMOS, [mvector@fcav.unesp.br](mailto:mvector@fcav.unesp.br). FCAV-UNESP, Via de acesso Prof. Paulo Donato Castellane, CEP: 14884-900, Jaboticabal - SP.

**Palavras-chave:** traça-das-crucíferas, PCR, controle microbiano, entomopatógenos.

### INTRODUÇÃO

A traça-das-crucíferas, *Plutella xylostella* (L., 1758) (Lepidoptera: Plutellidae), é a praga que provoca as maiores perdas em plantações de brássicas, principalmente repolho, em todas as regiões produtoras do mundo (ULMER *et al.*, 2002). As perdas com a ocorrência desse inseto num plantio podem

chegar a 100%, independente do período de desenvolvimento da planta em que ocorre, sendo que o prejuízo excedeu a 1 bilhão de dólares anual, já em 1993 nos Estados Unidos (TALEKAR & SHELTON, 1993).

Na tentativa de conter o problema ocasionado pela traça, o controle químico tem sido o método mais empregado a vários anos, no entanto, sua utilização incorreta tem provo-

cado a seleção cada vez mais freqüente de populações resistentes (CASTELO BRANCO *et al.*, 2003). Para minimizar esse problema, uma das alternativas empregadas é o controle biológico através da aplicação de inseticidas à base da bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* (Bt).

As diversas linhagens de *B. thuringiensis* produzem, em adição às  $\delta$ -endotoxinas, uma série de outras toxinas que podem ou não participar da ação entomopatogênica. A proteína Cyt, de peso molecular 28 kDa, é uma citolisina de ação inespecífica, sendo acumulada no cristal juntamente com as  $\delta$ -endotoxinas (LERECLUS *et al.*, 1993). Além desta, as proteínas Vip (“vegetative insecticidal proteins”), também produzidas por muitas linhagens de *B. thuringiensis*, possuem 80-100 kDa e apresentam amplo espectro de hospedeiros (ESTRUCH *et al.*, 1996).

Os resultados de controle obtidos inicialmente com Bt tornaram freqüente sua utilização; no entanto, a maioria dos produtos formulados com essa bactéria, encontrados no mercado, são formulados com *B. thuringiensis* var. *kurstaki* que expressa as toxinas CryIAa, CryIAb e CryIAc. Isto significa que as ligações das toxinas com o epitélio, no intestino do inseto, ocorrem através dos mesmos receptores de membrana, facilitando o aparecimento de populações resistentes, o que já vem sendo relatado (TANG *et al.*, 1996).

As primeiras observações da expressão de resistência de insetos a Bt foram em experimentos com pressão de seleção, em laboratório. Somente para *P. xylostella* foram constatadas populações de campo resistentes a Bt. Essas populações foram relatadas no Estados Unidos, América Central e Ásia (PEREZ & SHELTON, 1997; TABASHNIK, 1994; WRIGHT *et al.*, 1997; ZHAO *et al.*, 1993).

Para resolver estes problemas, vários podem ser os caminhos, incluindo-se o manejo da resistência (TABASHNIK *et al.*, 1998), que pode ser realizado através da utilização de diferentes bactérias entomopatogênicas eficientes contra a praga; formulações mistas de diferentes bactérias ou de

isolados de Bt, que apresentem vários *cry* (isolada ou conjuntamente). Dessa forma muitos pesquisadores e companhias vêm desenvolvendo programas de seleção global ou local para encontrar novos isolados com atividade inseticida aumentada.

Os isolados obtidos por estes programas têm seus genes *cry* identificados, na maioria das vezes, por meio de tecnologias baseadas na Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) com iniciadores com especificidade para diferentes genes. Além de ser usada com sucesso para determinar a distribuição desses genes em coleções naturais de isolados de *B. thuringiensis* (BEN-DOV *et al.*, 1997; BRAVO *et al.*, 1998; CAROZZI *et al.*, 1991; VILAS-BÔAS & LEMOS, 2004).

Nesse sentido, alguns trabalhos vêm sendo realizados para caracterizar populações de *B. thuringiensis*, eficientes contra *P. xylostella*, isolados de várias regiões do mundo, através de métodos morfológicos, bioquímicos e moleculares (BOBROWSKI *et al.*, 2001; MONERAT *et al.*, 2004, MEDEIROS *et al.*, 2005).

Com base nessas informações, o presente trabalho teve por objetivo caracterizar molecularmente 16 isolados de *B. thuringiensis*, bem como determinar a patogenicidade dos mesmos à traça-das-crucíferas.

## MATERIAL E MÉTODOS

Inicialmente foram selecionados 15 isolados: BR<sub>05</sub>, BR<sub>06</sub>, BR<sub>11</sub>, BR<sub>12</sub>, BR<sub>16</sub>, BR<sub>17</sub>, BR<sub>18</sub>, BR<sub>21</sub>, BR<sub>37</sub>, BR<sub>49</sub>, BR<sub>54</sub>, BR<sub>75</sub>, BR<sub>78</sub>, BR<sub>80</sub> e BR<sub>90</sub>; além das linhagens HD1 de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* e *B. thuringiensis* var. *tenebrionis*, da coleção do Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA) da FCAV-UNESP/Jaboticabal-SP, para utilização na identificação das subclasses do gene *cryI* e nos bioensaios. Para estes, foram utilizados espécimes de *P. xylostella* provenientes da criação mantida no Laboratório de Biologia e Criação de Insetos da mesma Universidade.

Todos os testes foram realizados em temperatura de 25±1°C, umidade relativa de

70±10% e fotofase de 12h, em sala climatizada.

### Extração de DNA pelo Kit InstaGene Matrix (Bio-Rad)

Os isolados de *B. thuringiensis* foram previamente cultivados em placas contendo meio NA sólido, por 12 h a 30°C. Para cada isolado uma colônia foi ressuspensa em 1 ml de água estéril em tubos de microcentrífuga e levados à centrifugação por 1 minuto a 15.000 x g a 20°C.

Após centrifugação o sobrenadante foi descartado, sendo adicionados 200 µl da Matriz InstaGene Matrix (Bio-Rad) e, em seguida, o material foi incubado em banho-maria a 56°C por 20 min, agitado rigorosamente em vórtex por 10 s e incubado em água fervente (100°C) por 8 min. A amostra foi novamente agitada em “vórtex” por 10 s e centrifugada a 20°C por 3 min. Finalmente, 200 µl do sobrenadante foram colhidos, transferidos para um poço de uma microplaca de polipropileno contendo 96 poços (DNA de um isolado/poço), a qual foi estocada em freezer - 20°C até o momento do uso.

### Identificação de subclasses do gene *cryI*

A identificação das subclasses do gene *cryI* nos isolados de *B. thuringiensis* estudados foi realizada para cinco subclasses:

*cryIAa*, *cryIAc*, *cryIB*, *cryIC* e *cryIF* (Tabela 1.). Os iniciadores para esses genes foram elaborados e otimizados no laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada.

As reações de amplificação para estes iniciadores foram conduzidas em um volume de 20 µl contendo: 20 ng de DNA molde, 250 µM de uma solução de dNTPs (10mM); 2,0 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,4 µM de cada iniciador; 1,0 U da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen®); solução tampão para a reação de PCR (1X) e água destilada Milli-Q previamente esterilizada (qsp 20 µl). Em todos os lotes de reação realizou-se um controle negativo no qual a quantidade de DNA foi substituída por água Milli-Q, previamente esterilizada.

As reações de amplificação foram realizadas em aparelho termociclador (PTC-100 “Programmable Thermal Controller” - MJ Research, inc.), equipado com circuito “Hot Bonnet”, onde foi utilizado o seguinte programa: um passo inicial de desnaturação de 5 min a 95°C e 31 ciclos consistindo de um ciclo de desnaturação a 95°C por 1 min; pareamento dos oligonucleotídeos a 48°C por 1 min e extensão a 72°C por 1 min e, ao final dos ciclos, um passo extra de extensão a 72°C por 5 min. Ao fim do programa foi adicionado um passo para a manutenção da amostra a 13°C até a retirada dos tubos do termociclador.

Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados no trabalho.

Iniciadores	Seqüências	Pares de bases amplificados (pb)	Número de Acesso
<i>cryIAB</i>	5' ATGAACAGTGCCCTTACAAC 3' 5' TACTTCCTTCTATGCCCTGAG 3'	423	M12661
<i>cryIAc</i>	5' ATCGCTCGTCTATCGGCATTG 3' 5' AGCCAGCCCTCACGTTCTTC 3'	400	U87793
<i>cryIB</i>	5' AACCCCTAACCGAAACGCTG3' 5' AGCACCGGAAGATACTAGAAG 3'	375	M23724
<i>cryICa</i>	5' GAAAGTGTGGAGAACCGAATC 3' 5' TGGGATAACAAGGACCGAAC 3'	616	AY955268
<i>cryIF</i>	5' TGTAGAGCCGTTTGTAGTG 3' 5' GCTTGGGAATAGTGGAC 3'	645	M63897

Após as ampliações, adicionou-se às amostras 2 µl de tampão de amostra (“loading buffer” - 0,5% de azul de bromofenol em glicerol 50%). Um volume de 15 µl de cada amostra foi aplicado em gel de agarose a 1,5%, contendo brometo de etídeo (0,5 µg/ml) e submetido à eletroforese horizontal por 2 h, a 70 V, conduzida em tampão TEB 1X (Tris 89 mM, EDTA 2,5 mM e Acido Bórico 89 mM com pH 8,3), também adicionado de brometo de etídeo (0,5 µg/ml). Em todas as eletroforeses realizadas foi adotado o emprego de uma amostra de DNA, com fragmentos de tamanhos conhecidos, múltiplos de 1kb “1kb DNA ladder”, produzida pela Invitrogen®, a qual serviu como referência de migração eletroforética para verificação dos tamanhos dos fragmentos obtidos nas reações de amplificação.

Os géis de agarose foram visualizados sob luz UV e fotodocumentados em equipamen-

to GEL DOC 2000 - Bio-Rad, através do software Quantity-one.

### Bioensaios

Nos bioensaios foram utilizados os mesmos isolados de *B. thuringiensis* dos testes moleculares, além do controle positivo *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (HD1), controle negativo *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* e água destilada esterilizada, com espalhante adesivo Tween 80®, como testemunha.

Os isolados foram mantidos em incubação por 96 h a 30°C até a completa esporulação, em meio NA (Nutriente Ágar) sólido, em placas de Petri com 10cm de diâmetro. As células bacterianas foram suspensas em água destilada esterilizada e espalhante adesivo para obtenção de suspensões bacterianas concentradas. Diluições sucessivas foram realizadas para quantificação dos esporos, em câmara de Neubauer, para padronizar as suspensões de

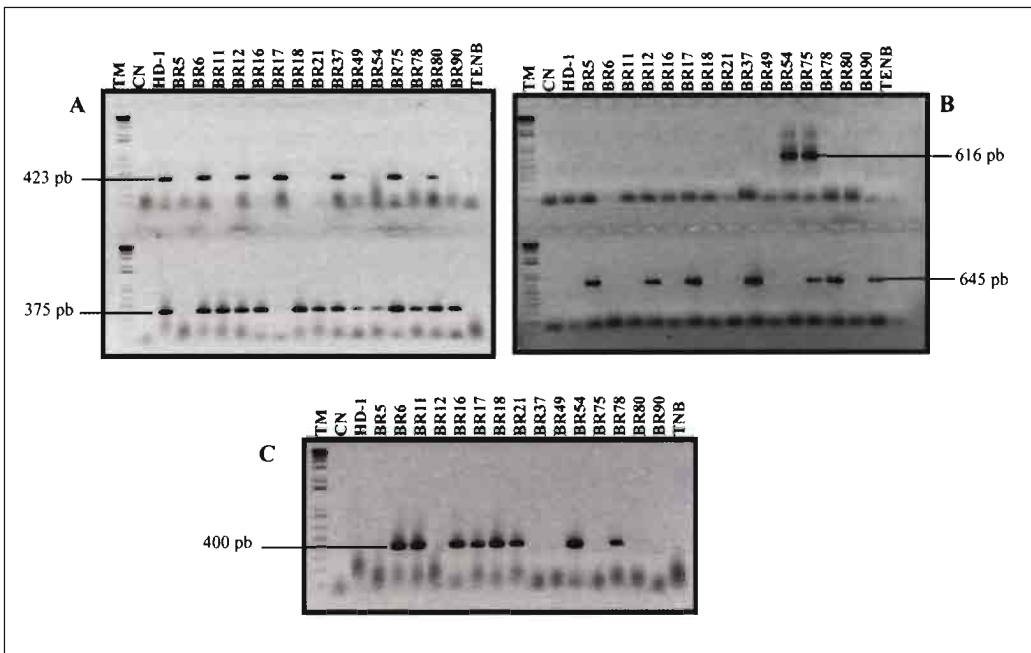


Figura 1. Eletroforogramas do material amplificado com os iniciadores específicos. A: *cry1Ab* e *cry1B*. B: *cry1C* e *cry1F*. C: *cry1Ac*. TM: Tamanho Molecular: 1kb plus DNA ladder. CN: Controle Negativo. BR05 a BR90: isolados de *B. thuringiensis*.

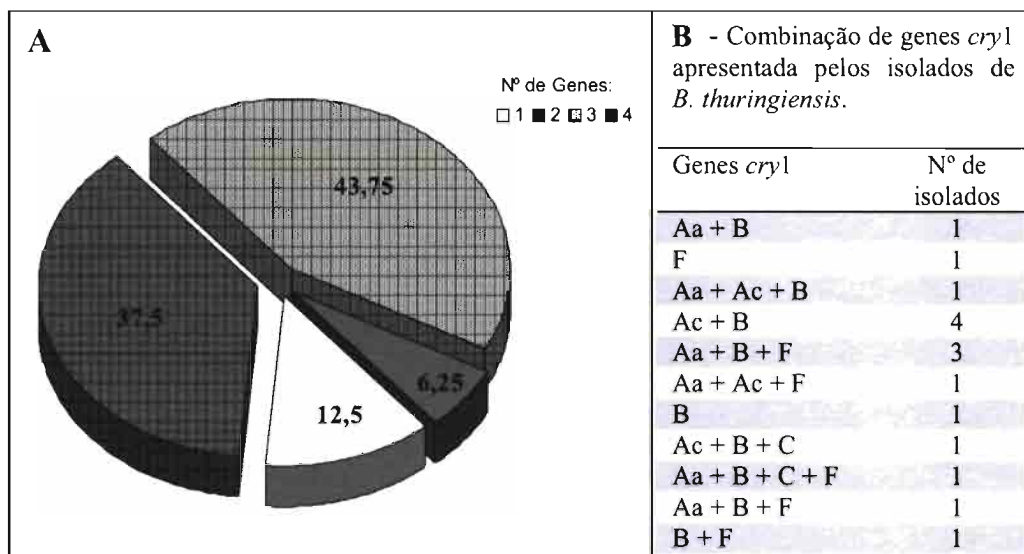


Figura 2. A) Frequência de genes *cry* nos isolados; B) Perfil gênico apresentado pelos isolados de *Bacillus thuringiensis*.

cada isolado numa concentração final de  $3 \times 10^8$  esporos/ml (solução de trabalho).

Após a obtenção da solução de trabalho para cada isolado, cinco discos foliares de couve cv. Manteiga foram tratados por pulverização das suspensões bacterianas e da testemunha (1ml/disco foliar), completando as 5 repetições por tratamento. Os discos tratados, secos ao ar livre, foram transferidos para placas de Petri, sobre papel filtro umedecido e sobre os mesmos foram colocadas 12 lagartas de 2ª instar de *P. xylostella*. As lagartas foram mantidas confinadas nas placas e diariamente foram feitas avaliações da mortalidade larval, até a formação das pupas, que foram retiradas das placas. Os dados de mortalidade obtidos foram submetidos a análise de variância e as médias confrontadas pelo teste de Tukey, probabilidade de 5%.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise molecular com utilização dos iniciadores específicos para os genes *cryI*Ab, *cryI*Ac, *cryI*B, *cryI*C e *cryI*F gerou produtos de PCR com fragmentos de tamanho

esperado (423, 400, 375, 616 e 645, respectivamente), indicando a presença desses genes em diferentes isolados (Figura 1A, B e C) com exceção da linhagem *B. thuringiensis* var. *tenebrionis*, utilizada como controle negativo para o gene *cryI*.

Os isolados estudados apresentaram perfis gênicos muito variados, uma vez que pela utilização da análise por PCR foi possível identificar cinco genes *cry*, em 16 isolados de *B. thuringiensis*. Desses, a maior frequência encontrada foi para o gene *cryI*B, encontrado em 14 isolados, seguido por *cryI*Ac (8 isolados) e *cryI*F (8), *cryI*Ab (7) e *cryI*C (2) (Tabela 2).

A variação na combinação desses genes formou vários grupos, incluindo os diferentes isolados, sendo possível demonstrar que a maior parte dos isolados apresentaram mais de um gene *cry*. Dentre os 16 isolados, 43,75% apresentaram três genes *cry*, 37,50% apresentaram dois, 12,50% apresentaram apenas um e 6,25% apresentaram quatro (Figura 2A). Foram observadas dessa forma, onze combinações de genes nos 16 isolados, sendo que quatro isolados apresentaram a

Tabela 2. Conteúdo gênico de isolados de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* de diferentes regiões brasileiras e atividade inseticida para lagartas de *Plutella xylostella*.

Isolados	Origem	<i>cry1Ab</i>	<i>cry1Ac</i>	<i>cry1B</i>	<i>cry1C</i>	<i>cry1F</i>	Mortalidade (%)
HD1	Bacillus Stock Center (EUA)	+	-	+	-	-	100,00
BR <sub>05</sub>	Cubatão/SP	-	-	-	-	+	98,00
BR <sub>06</sub>	Londrina/PR	+	+	+	-	-	100,00
BR <sub>11</sub>	Londrina/PR	-	+	+	-	-	100,00
BR <sub>12</sub>	Londrina/PR	+	-	+	-	+	100,00
BR <sub>16</sub>	Londrina/PR	-	+	+	-	-	100,00
BR <sub>17</sub>	Londrina/PR	+	+	-	-	+	100,00
BR <sub>18</sub>	Londrina/PR	-	+	+	-	-	100,00
BR <sub>21</sub>	Ribeirão Preto/SP	-	+	+	-	-	100,00
BR <sub>37</sub>	Grãos armazenados	+	-	+	-	+	100,00
BR <sub>49</sub>	Londrina/PR	-	-	+	-	-	100,00
BR <sub>54</sub>	Londrina/PR	-	+	+	+	-	100,00
BR <sub>75</sub>	Grãos armazenados	+	-	+	+	+	100,00
BR <sub>78</sub>	Grãos armazenados	-	+	+	-	+	100,00
BR <sub>80</sub>	Grãos armazenados	+	-	+	-	+	100,00
BR <sub>90</sub>	Grãos armazenados	-	-	+	-	+	100,00
var. <i>tenebrionis</i>	Bacillus Stock Center (EUA)	-	-	-	-	-	10,00
Test.		-	-	-	-	-	12,00

(+) presença, (-) ausência do gene; Test. = Testemunha (água+tween)

combinação dos genes *cry1Ac+cry1B* (maior frequência), três a combinação *cry1Ab+cry1B+cry1F* e os outros nove isolados apresentaram combinações diversificadas (Figura 2B).

Em função dos resultados obtidos não é possível se traçar uma correlação entre a presença/ausência dos genes *cry* estudados com a mortalidade ocasionada no bioensaio com *P. xylostella*, uma vez que todos os isolados utilizados ocasionaram mortalidades superiores a 98%, igualando-se ao tratamento padrão com o isolado HD-1 de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (Tabela 2).

Os principais resultados de controle com *B. thuringiensis* var. *kurstaki* foram obtidos com produtos encontrados no mercado, for-

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

Resultados positivos de controle de *P. xylostella* com *B. thuringiensis* foram obser-

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

Tendo em vista os casos freqüentes de resistência, uma das formas de se manejá-la em populações de campo é a utilização de novos isolados de *B. thuringiensis* que apre-

sentem perfis diferenciados quanto ao conteúdo de genes *cry*, como os encontrados nos isolados deste estudo.

A presença dos diferentes genes *cry* nos isolados estudados, obtidos pela análise de PCR, não significa que os mesmos estão sendo expressos, no entanto dão um forte indício de que estes isolados poderão ser empregados na construção de formulações comerciais efetivas contra diferentes pragas. Gera-se ainda, a possibilidade de novos estudos relacionados à expressão e inserção desses genes em plantas, mediante comprovação de sua atuação nas mortalidades geradas nos ensaios.

#### RESUMEN

THULER, A. M. G., R. T. THULER, E. S. CÍCERO, S. A. DE BORTOLI, M. V. F. LEMOS. 2007. Estudio de la variabilidad génica en aislados brasileños del *Bacillus thuringiensis* para la utilización en el control biológico del *Plutella xylostella*, *Bol. San. Veg. Plagas*, 33: 409-417.

El objetivo de este trabajo fue el de encontrar diferencias en el contenido de genes *cry* de los aislados más recientes de *Bacillus thuringiensis* en relación al linaje HD1, ampliamente utilizado en la formulación de productos comerciales, así como el de evaluar el efecto de los mismos sobre una población de *Plutella xylostella*, susceptible a la bacteria. Los aislados BR<sub>5</sub>, BR<sub>6</sub>, BR<sub>11</sub>, BR<sub>12</sub>, BR<sub>16</sub>, BR<sub>17</sub>, BR<sub>18</sub>, BR<sub>21</sub>, BR<sub>37</sub>, BR<sub>49</sub>, BR<sub>54</sub>, BR<sub>75</sub>, BR<sub>78</sub>, BR<sub>80</sub> y BR<sub>90</sub>; además del aislado HD1 y del control negativo *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* utilizados en este estudio, hacen parte de la colección del Laboratorio de Genética de Bacterias y Biotecnología Aplicada (LGBBA) de la FCAV-UNESP/Jaboticabal-SP. Para la realización del trabajo fueron realizadas reacciones de PCR utilizándose los iniciadores específicos para *cry1Aa*, *cry1Ac*, *cry1B*, *cry1C* y *cry1F*. Con las reacciones de PCR fueron observadas las siguientes amplificaciones: HD1 - *cry1Aa* y B; BR<sub>05</sub> - *cry1F*; BR<sub>06</sub> - *cry1Aa*, B y Ac; BR<sub>11</sub> - *cry1B* y Ac; BR<sub>12</sub> - *cry1Aa*, B y F; BR<sub>16</sub> - *cry1B* y Ac; BR<sub>17</sub> - *cry1Aa*, Ac y F; BR<sub>18</sub> - *cry1B* y Ac; BR<sub>21</sub> - *cry1B* y Ac; BR<sub>37</sub> - *cry1Aa*, B y F; BR<sub>49</sub> - *cry1B*; BR<sub>54</sub> - *cry1B*, Ac y C; BR<sub>75</sub> - *cry1Aa*, B, C y F; BR<sub>78</sub> - *cry1B*, Ac y F; BR<sub>80</sub> - *cry1Aa*, B y C y BR<sub>90</sub> - *cry1B* y F. En los bioensayos se observó 100% de mortalidad para orugas de *P. xylostella* con los aislados utilizados, exceptuándose el aislado BR<sub>05</sub> que causó 98%, indicando así que para una población susceptible a este insecto, como la utilizada en el presente estudio, la efectividad de la bacteria *B. thuringiensis* no depende del contenido de genes *cry* de cada aislado. Sin embargo, se sugiere que los aislados que presentaron perfiles diferentes en relación a los genes *cry* estudiados, puedan ser empleados en la formulación de nuevos bioformulados, para manejar la resistencia en casos en que los receptores de membrana sean diferentes de los presentados por los insectos resistentes a aislados como el HD-1, comúnmente encontrado en formulaciones comerciales.

**Palabras clave:** oruga de las crucíferas, PCR, control microbiano, entomopatógenos.

#### ABSTRACT

THULER, A. M. G., R. T. THULER, E. S. CÍCERO, S. A. DE BORTOLI, M. V. F. LEMOS. 2007. The study of genic variability in *Bacillus thuringiensis* Brazilian strains for use in the biological control of *Plutella xylostella*. *Bol. San. Veg. Plagas*, 33: 409-417.

The objective of this work was define the differences among *cry* genes of the more recent brazilian strains of *Bacillus thuringiensis* in relation to HD1 strain, commonly

used in commercial formulations. It was evaluated too its effects on larvae of a susceptible population of *Plutella xylostella*. The strains BR5, BR6, BR11, BR12, BR16, BR17, BR18, BR21, BR37, BR49, BR54, BR75, BR78, BR80 e BR90 (Brazilian strains), HD1 and negative control (*B. thuringiensis* var. *tenebrionis*) used in this study were from "Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA)" collection, located in the "FCAV-UNESP, Jaboticabal, SP". For accomplishment of this work, the specific starter for *cryIAa* had been carried through PCR reactions using itself, *cryIAa*, *cryIaC*, *cryIB*, *cryIC* e *cryIF*. By the PCR reactions the following amplifications were observed: HD1 - *cryIAa* and B; BR05 - *cryIF*; BR06 - *cryIAa*, B and Ac; BR11 - *cryIB* and Ac; BR12 - *cryIAa*, B and F; BR16 - *cryIB* and Ac; BR17 - *cryIAa*, Ac and F; BR18 - *cryIB* and Ac; BR21 - *cryIB* and Ac; BR37 - *cryIAa*, B and F; BR49 - *cryIB*; BR54 - *cryIB*, Ac and C; BR75 - *cryIAa*, B, C and F; BR78 - *cryIB*, Ac and F; BR80 - *cryIAa*, B and C and BR90 - *cryIB* and F. The bioassays showed mortalities of 100% to *P. xylostella* larvae by all strains, excepting BR05 that caused 98% of larvae mortality, indicating effectiveness of *B. thuringiensis* independently of the *cry* gene present. It is possible to suggest that the strains showing different profiles in relation to the *cry* genes studied, can be used to new *B. thuringiensis* formulations trying to manage the resistance in the cases where the membrane receptors are different from HD1 receivers of resistant insects, currently found in *B. thuringiensis* commercial formulations.

**Key words:** diamondback moth, PCR, microbial control, entomopathogens.

## REFERÊNCIAS

- BEN-DOV, E.; ZARISKY, A.; DAHAN, E.; BARAK, Z.; SINAI, R.; MANASHEROB, R.; KHAMRAEV, A.; TROITSKAYA, E.; DUBITSKY, A.; BERENZINA, N.; MARGALITH, Y. 1997. Extended screening by PCR for seven *cry*-group genes from field-collected strains of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**(12): 4883-4890.
- BOBROWISKY, V. L.; PASQUALI, G.; BODANESE-ZANETTINI, M. H.; FIUZA, L. M. 2001. Detection of *CryI* Genes in *Bacillus thuringiensis* isolates from south of Brazil and activity against *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Brazil. J. Microbiol.*, **32**: 105-109.
- BRAVO, A.; SARABIA, S.; LOPEZ, L.; ABARCA, C.; ORTIZ, A.; ORTIZ, M.; LINA, L.; VILLALOBOS, F. J.; PEÑA, G.; NÚÑEZ-VAIDIZ, M. E.; SOBERÓN, M.; QUINTERO, R. 1998. Characterization of *cry* genes in a mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**(12): 4965-4972.
- CAROZZI, N. B.; KRAMER, V. C.; WARREN, G. W.; EVOLA, S.; KOZIEL, M. G. 1991. Prediction of insectidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**(11), 3057-3061.
- CASTELO BRANCO, M.; FRANÇA, F. H.; PONTES, L. A.; AMARAL, P. S. T. 2003. Avaliação da suscetibilidade a inseticidas em populações de traça-das-crucíferas de algumas áreas do Brasil. *Hortic. Bras.*, **21**(3): 549-552.
- DIAS, D. G. S.; SOARES, C. M. S.; MONNERAT, R. 2004. Avaliação de larvicidas de origem microbiana no controle da traça-das-crucíferas em couve-flor. *Hortic. Bras.*, **22**(3): 553-556.
- ESTRUCH, J. J.; WARREN, G. W.; MULLINS, M. A.; NYE, G. J.; CRAIG, J. A.; KOZOEL, M. G. 1996. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**(11): 5389-5394.
- LERECLUS, D.; DELECLUSE, A.; LECADET, M. M. 1993. Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. In: *Bacillus thuringiensis* an environmental biopesticide: theory and practice. ENTWISTLE, P.F.; CORY, J.S.; BAILEY, M.J.; HIGGS, S. (Ed). Chichester: J. Wiley & Sons, p.37-70.
- MEDEIROS, P. T.; FERREIRA, M. N.; MARTINS, E. S.; GOMES, A. C. M. M.; FALCÃO, R.; DIAS, J. M. C. S.; MONNERAT, R. G. 2005. Seleção e caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas no controle da traça-das-crucíferas *Plutella xylostella*. *Pesq. agropec. bras.*, **40**(11): 1145-1148.
- MONNERAT, R. G.; LEAL-BERTIOLI, S. C. M.; BERTIOLI, D. J.; BUTT, T. M.; BORDAT, D. 2004. Caracterização de populações geograficamente distintas da traça-das-crucíferas por susceptibilidade ao *Bacillus thuringiensis* Berliner e RAPD-PCR. *Hortic. Bras.*, **22**(3): 607-609.
- PEREZ, C. J.; SHELTON, A. M. 1997. Resistance of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) to *Bacillus thuringiensis* Berliner in Central America. *J. Econ. Entomol.*, **90**(1): 87-93.
- TABASHNIK, B. E. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Ann. Rev. Entomol.*, **39**: 47-79, 1994.
- TABASHNIK, B. E.; LIU, Y. B.; MALVAR, T.; HECKEL, D. G.; MASSON, L.; FERRÉ, J. 1998. Insect resistance to *Bacillus thuringiensis*: uniform or diverse? *Philos. Trans. R. Soc., Ser. B*, **353**(1376): 1751-1756.
- TALEKAR, N. S.; SHELTON, A. M. 1993. Biology, ecology and management of the diamondback moth. *Ann. Rev. Entomol.*, **38**: 275-301.
- TANG, J. D.; SHELTON, A. M.; VAN RIE, J.; DE ROECK, S.; MOAR, W. J.; ROUSH, R. T.; PEFFEROEN, M. 1996. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* spore and crystal protein to resistant diamondback moth (*Plutella xylostella*). *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**(2): 564-569.



- ULMER, B. C.; GILLOTT, C.; WOODS, D.; ERLANDSON, M. 2002. Diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). feeding and oviposition preferences on glossy and waxy *Brassica rapa* (L.) lines. *Crop Protection*, **21**(4): 327-331.
- VILAS-BOAS, G. T., LEMOS, M. V. 2004. Diversity of cry genes and genetic characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from Brazil. *Can. J. Microbiol.*, **50**(8): 605-613.
- WRIGHT, D. J.; IQBAL, M.; GRANERO, F.; FERRÉ, J. 1997. A change in a single midgut receptor in the diamondback moth (*Plutella xylostella*) is only part responsible for field resistance to *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*. *App. Environ. Microbiol.*, **63**(5): 1814-1819.
- ZHAO, J. Z.; ZHU, G. R.; ZHU, Z. L.; WANG, W. Z. 1993. Resistance of diamondback moth to *Bacillus thuringiensis* in China. *Resist. Pest Manag.*, **5**(1): 11-12.

(Recepción: 9 enero 2007)

(Aceptación: 1 junio 2007)